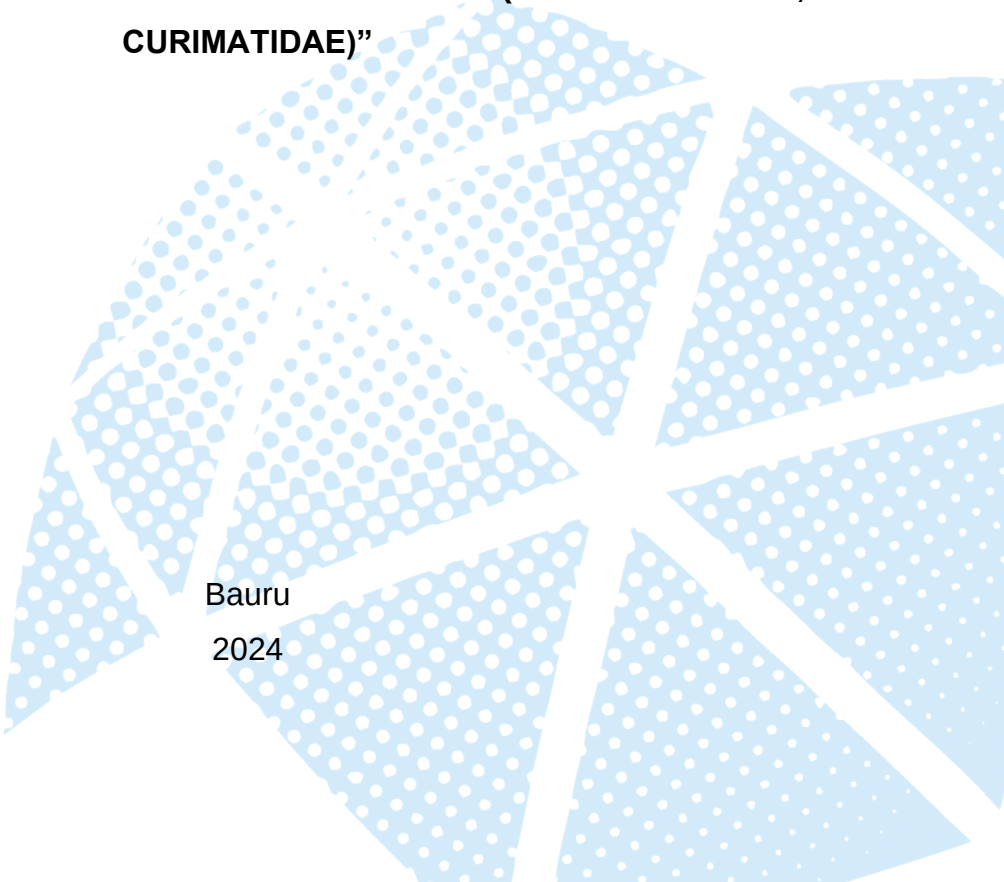


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Campus de Bauru

NATÁLIA DOS SANTOS

**“DIVERGÊNCIA MOLECULAR E COMPOSIÇÃO GENÔMICA DE
CROMOSSOMOS B EM *CYPHOCHARAX MODESTUS* (CHARACIFORMES,
CURIMATIDAE)”**

Bauru
2024



NATÁLIA DOS SANTOS

**“DIVERGÊNCIA MOLECULAR E COMPOSIÇÃO GENÔMICA DE
CROMOSSOMOS B EM *CYPHOCHARAX MODESTUS* (CHARACIFORMES,
CURIMATIDAE)”**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, para obtenção do título de Mestra em Biociências.

Área de Concentração: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Utsunomia

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Porto Foresti

Bauru

2024

S237d

Santos, Natália dos

Divergência molecular e composição genômica de cromossomos B em *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae) / Natália dos Santos. -- Bauru, 2024

60 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Ricardo Utsunomia

Coorientador: Fabio Porto-Foresti

1. Citogenética animal. 2. Genômica. 3. Characiformes. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATALIA DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de setembro do ano de 2024, às 09:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NATALIA DOS SANTOS, intitulada **“DIVERGÊNCIA MOLECULAR E COMPOSIÇÃO GENÔMICA DE CROMOSSOMOS B EM CYPHOCHAX MODESTUS (CHARACIFORMES, CURIMATIDAE)”**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Dr. CAIO AUGUSTO GOMES GOES (Participação Presencial) do(a) Faculdade de Ciências - Unesp/Campus de Bauru, Profa. Dra. GEIZE APARECIDA DEON (Participação Presencial) do(a) Universidade Federal de São Carlos. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovado . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO UTSUNOMIA**
Data: 30/09/2024 15:08:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico este trabalho à minha família,
Francisca, Arnaldo, Gustavo, Massao,
Erina e João Dourado.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, sempre acreditando em mim e me incentivando a seguir em frente em busca dos meus sonhos. Em especial aos meus pais, Francisca e Arnaldo e ao meu irmão Gustavo. Sua presença e amor foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui e com certeza me levarão cada vez mais longe.

Agradeço ao meu namorado, Massao, que sempre foi uma inspiração para mim. Obrigada pelo amor e apoio diariamente, que foram fundamentais durante toda essa jornada. Sua compreensão, suporte e incentivo me motivaram a sempre seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Sou eternamente grata por ter você ao meu lado, sempre acreditando em mim e celebrando cada conquista juntos.

Agradeço a Erina Kodama e João Dourado pelo acolhimento e apoio durante essa jornada. Sua gentileza e incentivo foram fundamentais, sempre me motivando a dar o meu melhor. Sou grata por toda a confiança e carinho que me ofereceram, me ajudando a seguir em frente para realizar meus sonhos e conquistar meus objetivos.

Agradeço a todos os meus queridos amigos da família Lagenpe, em especial a Zeni, Henrique, Goes, Gabi, Amandinha, Hélio, Auany, Vitor, Kevin, Camila e Verônica, por todos os momentos que compartilhamos. Seja durante os cafés, almoços, comemorações ou nas horas difíceis, sempre estive cercada de apoio e compreensão. Sou grata por cada risada e lágrima dividida, e por sempre estarem prontos para me ouvir. Esses momentos preciosos ficarão guardados comigo para sempre. Agradeço a todos os amigos do laboratório, tanto os atuais quanto os antigos, e que de alguma forma me apoiaram.

Ao Rodrigo Zeni, em especial, agradeço por me acompanhar desde o início e por todos os ensinamentos, tanto dentro quanto fora do laboratório. Por sempre acreditar em mim, me ouvir, me aconselhar e estar ao meu lado em todos os momentos me apoiando e torcendo por mim. Sou profundamente grata por sua amizade e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço aos amigos que acompanharam este processo e que de alguma forma me incentivaram, tanto os de perto quanto de longe. Ao meu irmão de coração,

Israel, aos amigos Minhoca, Júlio e Eduardo por tornarem meus momentos de descanso mais divertidos e descontraídos. Obrigada pelas inúmeras conversas, jogos, suporte emocional e por todos os momentos alegres que tornaram essa jornada mais leve e agradável.

Agradeço à minha psicóloga, Isa, pelo apoio e orientação que me proporcionou ao longo desta jornada. Por todos as conversas e reflexões que foram fundamentais para meu crescimento pessoal e emocional e que me permitiram continuar perseguindo meus sonhos. Sou profundamente grata por todo o suporte que me ofereceu, pelo carinho e pela sua amizade.

Ao pessoal da UFSCAR, Marcelo, Francisco e Renata, agradeço a ajuda com meu trabalho e a todos do grupo pelos momentos compartilhados em congressos e encontros científicos. Seu apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto, e sou imensamente grata por toda a colaboração.

Ao meu orientador, expresso minha gratidão pelo apoio e pela orientação. Sua experiência e dedicação foram essenciais para meu desenvolvimento acadêmico. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e por escolher acreditar em mim, junto com sua dedicação em me guiar ao longo desta jornada e sua disposição para me ouvir que foram fundamentais para meu crescimento. Obrigada pelo apoio e pela colaboração nesse processo.

Ao meu co-orientador Fabio, agradeço por ter me acolhido desde a iniciação científica e por ter acreditado em mim sempre. Por me ouvir e se preocupar genuinamente comigo, oferecendo conselhos e ajuda sempre que precisei. Sua dedicação em fazer o possível para me ajudar e sua tranquilidade foram fundamentais ao longo dessa jornada. Sou imensamente grata por todo o apoio, experiências enriquecedoras, oportunidades, e pelo carinho e acolhimento que sempre me ofereceu.

Por fim, sou grata a todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, seja com palavras de encorajamento, descontração, apoio técnico ou inspiração. Cada um de vocês fez a diferença nessa trajetória.

“Everything in life is a learning experience... As long as you're learning, you're not failing.”

(Bob Ross).

RESUMO

Os cromossomos B, também conhecidos como cromossomos supranumerários, representam elementos dispensáveis encontrados em organismos eucarióticos, os quais estão presentes em diversas espécies de peixes, incluindo em representantes de Characiformes. Elementos repetitivos como os DNAs satélites (satDNAs) têm tendência de acumularem em regiões de baixa recombinação, como por exemplo, nos cromossomos supranumerários. Em *Cyphocharax modestus*, (Teleostei: Characiformes), a presença de cromossomos B tem sido documentada em diversas populações, embora existam poucos estudos buscando analisar DNAs repetitivos nesta espécie. Portanto, visando aumentar o conhecimento sobre a composição dos cromossomos B nesta espécie, caracterizamos o satelitoma de *C. modestus* e identificamos duas variantes do cromossomo B (aqui chamadas de B_e e B_h) as quais se distinguem por sua morfologia, padrões de heterocromatina e composição de sequências repetitivas. Com a utilização da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e genômica comparativa (CGH) em satélites com maior abundância no portador de cromossomo B foi possível notar que as variantes encontradas podem ter origem intraespecífica e tenham seguido trajetórias evolutivas distintas. Além de caracterizar pela primeira vez o satelitoma desta espécie em um indivíduo portador de cromossomo B e encontrar um satélite específico deste cromossomo, encontramos pela primeira vez um indivíduo portador de cinco cromossomos B, aumentando o conhecimento sobre a composição genômica e a diversidade estrutural dos cromossomos B nessa espécie. Dessa forma, a análise dos cromossomos B e dos DNAs satélites em peixes como *C. modestus* contribui significativamente para a compreensão da evolução genômica, origem e diferenciação desses elementos e da diversidade biológica presente nesses organismos.

Palavras-chave: Citogenética animal; Genômica; Characiformes.

ABSTRACT

B chromosomes, also known as supernumerary chromosomes, are dispensable genetic elements found in eukaryotic organisms, including several fish species, such as those in the order Characiformes. Repetitive elements, such as satellite DNAs (satDNAs), tend to accumulate in regions with low recombination rates, such as supernumerary chromosomes. In *Cyphocharax modestus* (Teleostei: Characiformes), the presence of B chromosomes has been documented across several populations, although few studies have focused on analyzing repetitive DNAs in this species. To enhance our understanding of the composition of B chromosomes in *C. modestus*, we characterized the satellitome of this species and identified two variants of the B chromosome (designated B_e and B_h), distinguished by their morphology, heterochromatin patterns, and repetitive sequence composition. Using fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) to analyze satellites with greater abundance in B chromosome carriers, we observed that these variants likely have an intraspecific origin and have followed distinct evolutionary trajectories. In addition, for the first time, we characterize the satellitome of this species in an individual carrying a B chromosome and identifying a specific satellite associated with this chromosome, we also documented, for the first time, an individual carrying five B chromosomes. This finding expands our knowledge of the genomic composition and structural diversity of B chromosomes in this species. Thus, the study of B chromosomes and satellite DNAs in fish species such as *C. modestus* significantly contributes to our understanding of genomic evolution, the origin and differentiation of these elements, and the biological diversity present in these organisms.

Keywords: Animal cytogenetics; Genomics; Characiformes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Cromossomos B	12
1.2	Sequências repetitivas com ênfase em dnas satélites	14
1.3	Família curimatidae com ênfase na espécie <i>Cyphocharax modestus</i> ...	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Coleta de indivíduos e análises citogenéticas	19
3.2	Estimulação de mitoses e obtenção de cromossomos metafásicos	20
3.3	Caracterização da heterocromatina constitutiva	22
3.4	Microscopia e processamento de imagens.....	22
3.5	Sequenciamento das leituras curtas.....	22
3.6	Análises bioinformáticas em servidor remoto e protocolos de bioinformática.....	23
3.7	Desenho de primers e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
3.8	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	25
3.9	Hibridização genômica comparativa (CGH).....	27
4	RESULTADOS	27
4.1	Caracterização citogenética.....	27
4.2	Caracterização e análise do satelitoma	29
4.3	Distribuição cromossômica dos cmosatdna.....	30
4.4	Divergência intra e intergenômica	34
4.5	Hibridização genômica comparativa (CGH).....	36
5	DISCUSSÃO.....	37
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS	41
8	INFORMAÇÕES SUPLEMENTAR	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cromossomos B

Cromossomos B, também conhecidos como cromossomos supranumerários ou acessórios, são elementos genômicos extras e dispensáveis presentes nos genomas de cerca de 15% eucariotos (Camacho 2005). Foram identificados pela primeira vez por Wilson (1907) em um inseto do gênero *Metapodius* (atualmente *Acanthocephala*), nomeados de supranumerários por Longley (1927) e, finalmente chamados de cromossomos B por Randolph (1928) (Douglas & Birchler, 2017). Em plantas, estes elementos foram identificados pela primeira vez no centeio (*Secale cereale*) por Gotoh (1924) e no milho (*Zea mays*) por Kuwada (1925). Já em peixes neotropicais de água doce, o primeiro relato de cromossomos B foi para a espécie *Prochilodus lineatus* (Pauls & Bertollo, 1983). Desde então, contando com cerca de 5760 publicações até 2016, diversos estudos vêm contribuindo para aumentar o conhecimento sobre os cromossomos B em diferentes grupos, abrangendo 2828 espécies eucarióticas, incluindo plantas, animais e fungos (D'Ambrosio et al., 2017).

Essencialmente, estes cromossomos podem ter uma origem intraespecífica, derivando dos cromossomos A da própria espécie hospedeira, ou uma origem interespecífica, resultante de processos de hibridização (McAllister et al., 1997; Camacho, 2000; Pansonato-Alves et al., 2014; Utsunomia et al., 2016). Eles são excelentes exemplos de conflito genômico, pois não são essenciais para o ciclo de vida dos organismos e são distintos pela herança não mendeliana com uma segregação irregular durante a meiose (Camacho et al., 2000; Karafiátová et al., 2021). De modo geral, esses cromossomos não possuem uma função definida, sendo classificados como elementos parasitários (Camacho et al., 2000; Gravena et al., 2007; Sampaio et al., 2011; Houben, 2017; Stornioli et al., 2021), não conseguem recombinar com os cromossomos A durante a meiose (Jones et al., 2008; Houben et al., 2012) e podem utilizar da maquinaria celular necessária para replicação e transmissão (Camacho, 2000; Douglas & Birchler, 2017).

Devido à sua natureza parasitária, os cromossomos B são capazes de modular o funcionamento das células para beneficiar suas próprias taxas de transmissão, um processo conhecido como "drive" (Camacho et al., 2000; Oliveira, 2010). O "drive" se refere ao sucesso na transmissão dos cromossomos B, que está ligado a taxas de

transmissão mais altas do que o esperado pelas leis mendelianas (Camacho, 2005; Burt e Trivers, 2006; Houben et al., 2017; Jones et al., 2018; Blavet et al., 2021). Uma vez que esses cromossomos surgem, acredita-se que os cromossomos B passam por um ciclo que inclui: i) invasão; ii) neutralização; e iii) extinção, a menos que sejam substituídos por uma nova variante de cromossomo B e passem novamente pelo "drive" (Camacho et al., 2000). Em plantas, o "drive" acontece após a meiose, enquanto em animais, ocorre na fase pré-meiótica ou durante a meiose, processo já descrito para diversas espécies como milho, gafanhotos e em alguns mamíferos (Douglas & Birchler, 2017).

A diversificação intraespecífica de variantes de B tem sido amplamente relatada em diferentes grupos e pode mostrar variação estrutural, morfológica, de tamanho, quantidade de heterocromatina-constitutiva, conteúdo de DNA e taxas de transmissão (López-León et al., 1993; Houben et al., 1999; Penitente et al., 2013). Essa diversificação já foi observada nos Characiformes como por exemplo: *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Utsunomia et al. 2016), *Prochilodus lineatus* (Artoni et al. 2006) e *Psalidodon bockmanni* (Daniel et al., 2012). Além disso, um mesmo indivíduo pode apresentar diferença na quantidade desses elementos a nível celular ou intrapopulacional (Jones et al., 2008) e ainda, em algumas espécies, o acúmulo de B pode ocorrer exclusivamente em um ou em ambos os sexos (Douglas & Birchler, 2017).

A presença dos cromossomos B pode ter efeitos negativo, neutro ou positivo em seu hospedeiro (Douglas & Birchler, 2017). Em baixa quantidade apresentam nenhum ou pouco impacto, mas em grande quantidade causam diferenças fenotípicas e podem afetar a fertilidade do hospedeiro (Houben et al., 2003; Houben et al., 2014). Embora a composição e função dos cromossomos B permaneçam desconhecidas em muitos casos, o uso da Hibridação *in situ* Fluorescente (*Fluorescent in situ Hybridization* – FISH) e Sequenciamento de Nova Geração (*Next-generation Sequencing* – NGS) têm possibilitado a caracterização de genes repetitivos e de cópia única (Houben et al., 2014; Makunin et al., 2014) que ajudaram a esclarecer a origem dos cromossomos B (Martins et al., 2012, Yoshida et al., 2011; Trifonov et al., 2013) e sugerem que parte do seu DNA pode ser funcional em algumas espécies, como em *Eyprepocnemis plorans* (Ruiz-Estevéz et al., 2012). Outro exemplo é o complexo de espécies *Psalidodon scabripinnis*, em que os cromossomos B apresentam expressão

gênica própria, evidenciando genes relacionados ao ciclo celular e à diferenciação das gônadas (Silva et al., 2022).

O estudo dos cromossomos B mostra as complexas interações coevolutivas que atuam nos organismos e nos seus elementos genéticos e, embora tenha ocorrido diversos avanços na compreensão desses elementos, ainda há muito a investigar sobre suas origens, trajetórias evolutivas, impactos e futuros desenvolvimentos (Camacho, 2005).

Nesse contexto, observam-se nos cromossomos B de animais e plantas os DNAs satélites (satDNAs) como uma das sequências mais predominantes (Mestriner et al., 2000; Martins et al., 2012; Silva et al., 2014; Milani et al., 2018; Dhar et al., 2019; Blavet et al., 2021). Essas sequências repetitivas são propensas a se acumular nos cromossomos B similar ao mecanismo de Muller's *ratchet* (Green, 1990; Camacho et al., 2000; Charlesworth et al., 2005; Plohl et al., 2012), que sugere que pequenas populações assexuadas acumulam mutações deletérias devido ao efeito amplificado da deriva genética e ao aumento da taxa de mutação associado ao reduzido tamanho populacional (Muller, 1964; Howe & Denver, 2008). Além disso, essas sequências têm sido amplamente utilizadas para investigar a função na organização e evolução do genoma (Moraes et al., 2023).

1.2 Sequências repetitivas com ênfase em DNAs satélites

Os genomas de eucariotos apresentam diversas sequências de DNA repetitivo que incluem elementos transponíveis, famílias multigênicas e repetições em tandem (satélites, minissatélites e microssatélites) (Charlesworth & Stephan, 1994; Jurka, et al. 2005; Oliveira, 2020). As sequências de DNA repetitivo são instrumentos importantes para estudos evolutivos devido à concentração de variações que produzem diversas cópias durante o processo evolutivo. Elementos transponíveis e sequências repetidas em tandem frequentemente desempenham um papel importante na evolução de cromossomos B, pois esses elementos normalmente não sofrem recombinação (Camacho et al., 2000). Portanto, compreender essas sequências permite entender a organização e o comportamento evolutivo dos genomas de organismos eucariotos e seus possíveis impactos nos cromossomos (Oliveira, 2020).

Os DNAs satélites são unidades monoméricas com tamanhos variados e repetidas em tandem, organizadas em uma orientação cabeça-a-cauda de forma

sequencial, podendo abranger de dezenas a milhões de repetições. São localizados principalmente na heterocromatina pericentromérica e subtelomérica, mas também pode estar espalhado pelas regiões eucromáticas (Plohl et al., 2012). Anteriormente conhecidos como DNA “lixo”, os satDNAs podem estar relacionados a algumas funções, entre elas centromérica, além de serem um dos principais componentes da heterocromatina, uma região do genoma que permanece quase sempre condensada e com pouca presença de genes (Ruiz-Ruano et al., 2016). Apesar de abundantes nos genomas de organismos eucarióticos, os satDNAs foram pouco estudados até o começo de 2010, o que pode ser atribuído à falta de ferramentas genômicas até aquele momento (Oliveira, 2020; Stornioli et al., 2021).

Com o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas, tornou-se possível a caracterização de catálogos dos satDNAs em espécies de interesse, cujas informações têm contribuído significativamente para a compreensão da evolução de determinadas sequências e do papel dessas sequências na evolução e diferenciação de cromossomos sexuais e supranumerários (Ruiz-Ruano, 2016; Novák et al., 2013; Utsunomia et al., 2016; Stornioli et al., 2021). Por meio da técnica de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*), têm sido conduzidas diversas análises genômicas em espécies que careciam de estudos prévios, possibilitando a identificação de sequências repetitivas como os satDNAs e, conseqüentemente, sua utilização em diversos estudos, voltados para questões evolutivas, de filogenias e diversidade genômica (Ruiz-Ruano et al., 2016; Moraes et al., 2023; Kretschmer et al., 2024).

O primeiro trabalho a descrever o catálogo de satDNAs (também chamado de satelitoma) utilizando o RepeatExplorer foi de Ruiz-Ruano et al. (2016) para o gafanhoto-migratório (*Locusta migratória*). Até então, os satDNA eram analisados por enzima de restrição e eletroforese, porém essas técnicas apresentavam limitações.

O uso dessas novas ferramentas, aliado à citogenética, permite compreender a organização genômica dos cromossomos, principalmente da fração repetitiva, possibilitando a montagem de bibliotecas de leituras curtas com alta qualidade, mesmo em espécies sem genoma de referência (Toma et al., 2023). Um dos programas que possibilitaram isso é o *RepeatExplorer*, que fornece ferramentas para encontrar sequências repetitivas em genomas, permitindo e auxiliando nas análises comparativas (Oliveira, 2020). Além do mapeamento de regiões repetitivas, outras técnicas como a FISH e a CGH (*Comparative Genomic Hybridization* - Hibridização

genômica comparativa) possibilitam realizar comparações entre diferentes populações, ajudando a evidenciar a evolução de cariótipos em níveis intra e interespecíficos (Toma et al., 2023). Dessa forma, a análise da distribuição do satDNA nos cromossomos A e B por meio da FISH tem fornecido informações valiosas sobre a origem dos cromossomos B em: gafanhotos (Ruiz-Ruano et al. 2017, 2018); peixes (Silva et al. 2017) e de cromossomos sexuais (Utsunomia et al. 2019).

Em peixes, o primeiro satelitoma caracterizado utilizando RepeatExplorer e satMiner foi publicado por Silva et al. (2017) para *Astyanax paranae* (atualmente, *Psalidodon paranae*), utilizando o genoma de indivíduos com e sem cromossomo B mostrando o compartilhamento de DNA satélites entre *P. paranae*, *fasciatus* e *bockmanni*. Após isso, diversos outros trabalhos contribuíram para os estudos de satelitoma em peixes como, por exemplo: *Megaleporinus macrocephalus* onde foram encontrados satélites exclusivos no cromossomo W (Utsunomia, 2019); *Megaleporinus elongatus* onde o acúmulo de satDNAs contribui para a diferenciação do cromossomo sexual W1 (Crepaldi et al., 2021); *Harttia carvalhoi*, o primeiro estudo de satelitoma em Siluriformes, onde foram identificados satélites conservados em cromossomos sexuais e regiões de rearranjos cromossômicos (Deon et al., 2024); em *Triportheus auritus* utilizando seu satelitoma para comparar com outras espécies da mesma família, mostrando um padrão diferente de acúmulo de satDNAs no cromossomo sexual de cada espécie (Kretschmer et al., 2022); *Characidium gomesi* utilizando os satDNA para investigar a origem do cromossomo B (Serrano-Freitas et al., 2020); *P. lineatus* sugerindo origem do B a partir de cromossomo A e identificando famílias de satDNA compartilhadas com *M. macrocephalus* (Stornioli et al., 2021) e; *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* evidenciando o compartilhamento de satDNA entre essas espécies (Goes et al., 2022).

Embora o número de estudos envolvendo satDNA vem crescendo e contribuindo para a compreensão desta classe de DNA repetitivo em diversos grupos, especialmente os Characiformes, ainda existem lacunas para alguns grupos que não possuem nenhum satelitoma descrito até o momento. Dessa forma, a localização dos satDNAs nos cromossomos B pode ajudar a esclarecer a evolução desses componentes genéticos, incluindo sua origem e diferenciação.

1.3 Família Curimatidae com ênfase na espécie *Cyphocharax modestus*

Desde então, diversos estudos realizados ao longo de décadas no Brasil vêm contribuindo para a citogenética de peixes Neotropicais, através de descobertas sobre a diversidade cromossômica e genômica desses peixes (Bertollo et al., 2017). Além disso, estudos em diversas populações de *C. modestus* indicaram a presença de cromossomos B variando em número e composição heterocromática (Gravena et al., 2007; Santos et al., 2008; Sampaio et al., 2011; Moraes et al., 2022).

Os peixes representam um dos grupos mais diversos entre os vertebrados, abrangendo espécies que podem ser encontradas em diversos ambientes aquáticos e desempenham um papel fundamental na cadeia trófica como predadores, fonte de alimento e até mesmo recicladores devido ao hábito detritívoro (Carmassi et al., 2008; Moraes et al., 2022; Santos et al., 2008). Cerca de 50% das espécies de peixes neotropicais com cromossomos B pertencem à ordem dos Characiformes e, destes, cerca de 13% são correspondentes a família Curimatidae (Carvalho et al., 2008; Lui et al., 2021). Apresentando 37 espécies válidas, o gênero *Cyphocharax* é o mais diversificado dentro de Curimatidae (Vari et al., 2012; Melo et al., 2014).

Dentro da ordem dos Characiformes, a família Curimatidae (quarta maior família de peixes Characiformes neotropicais detritívoros), engloba 117 espécies distribuídas em 8 gêneros: *Curimata*, *Curimatella*, *Curimatopsis*, *Cyphocharax*, *Potamorhina*, *Psectrogaster*, *Pseudocurimata* e *Steindachnerina* que são amplamente distribuídas nos rios da América Central e América do Sul (Brassesso et al., 2004; Oliveira, 2010; Melo, 2018; Moraes et al., 2022).

Embora apresentem uma complexa história evolutiva, Melo et al. (2018) mostra tanto a monofilia do grupo quanto a posição de gêneros específicos utilizando análises moleculares, onde *Curimatopsis* seria irmã de todos os outros grupos. Além disso, o gênero *Cyphocharax* seria parafilético contendo *Steindachnerina* (monofilético) e *Curimatella* (polifilético). Ainda assim, baseado em análises moleculares, algumas espécies desse gênero mostram uma maior proximidade filogenética entre si, enquanto outras são mais distantes. (Melo et al., 2018).

Citogeneticamente, a maioria das espécies da família Curimatidae apresenta $2n=54$, com o cariótipo majoritariamente composto de cromossomos biarmados (Sampaio et al., 2016), metacêntricos e submetacêntricos. Porém, a presença de cromossomos B vem sendo descrita para diferentes grupos de peixes, incluindo os

Characiformes (Santos et al., 2008), onde algumas espécies de Curimatidae (como em *Cyphocharax gouldingi*, *Cyphocharax spilatus*, *Steindachnerina biornata* e *Steindachnerina insculpta*) também podem apresentar cromossomos supranumerários pequenos (Gravena et al., 2007; Santos et al., 2008; Sampaio et al., 2011, 2015, 2016). Apesar da estabilidade do cariótipo, a presença de cromossomos supranumerários já foi observada em *C. modestus* (Sampaio, 2016; Santos et al., 2008; Oliveira, 2010), onde foram descritos pela primeira vez em 1985 por Venere e Galetti, sendo classificados como heterocromáticos.

Figura 1: Espécime de *C. modestus* coletado no Rio Batalha, pertencente à Bacia do Rio Tietê.



Fonte: Autor.

A espécie *C. modestus* (Fernández-Yépez, 1948), popularmente conhecida como "saguirus", é encontrada na América do Sul e partes da América Central, atingindo no máximo 17 cm de tamanho (Perez, 2014). Esses peixes são presentes na Bacia do Alto Paraná e abundantes em reservatórios de hidrelétricas, sendo importantes na ciclagem de nutrientes devido ao hábito alimentar detritívoro (Carmassi et al., 2008; Perez, 2014; Moraes et al., 2022). Porém, até agora os trabalhos envolvendo esta espécie focam em descrições convencionais usando especialmente dados citogenéticos.

Dessa forma, o estudo dos satDNAs é fundamental para compreender a evolução cromossômica nesta família (Oliveira, 2010). Neste trabalho, foram analisadas duas populações de *C. modestus*, uma do Rio Batalha e outra do Córrego Campo Novo, ambas pertencentes à Bacia do Rio Tietê, integrando citogenética molecular e análises bioinformáticas para revelar a composição e diversificação de cromossomos B nesta espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando o sistema de cromossomos B distintos em *C. modestus*, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar o satelitoma de *C. modestus* e verificar a localização cromossômica dessas sequências, a fim de diagnosticar satélites exclusivos de cada variante de B presente nesta espécie e assim, gerar novas informações acerca da origem e evolução dos cromossomos supranumerários. Neste estudo, exploramos: i) a composição genômica dos cromossomos B; ii) se apresentam origens comuns ou independentes.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar e analisar o conteúdo de DNAs satélites de *C. modestus* em dois indivíduos, um com zero e um com três cromossomos B.
2. Estudar a biologia estrutural e evolutiva de famílias de DNAs satélites.
3. Caracterizar os DNAs satélites específicos dos cromossomos B de *C. modestus*, focando na estrutura e organização cromossômica.
4. Mapear as regiões cromossômicas onde os DNAs satélites isolados estão localizados.
5. Analisar as diferenças na distribuição de DNAs satélites nos cromossomos B.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de indivíduos e análises citogenéticas

Duas populações da espécie *C. modestus* foram analisadas, denominadas neste trabalho como CN (Córrego Campo Novo) e BR (Rio Batalha), conforme

especificado na Tabela 1 e Figura 2. A coleta foi realizada com a aprovação dos órgãos ambientais brasileiros ICMBIO/SISBIO (Licença 3245). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP), protocolo 1204-CEUA/2019. Suspensões celulares contendo cromossomos metafásicos mitóticos foram obtidas a partir de células renais anteriores, seguindo o protocolo descrito por Foresti et al. (1981), e o bandeamento C destas amostras foi realizado de acordo com Sumner (1972). Amostras de tecido hepático também foram coletadas para experimentos subsequentes de biologia molecular (descritos na próxima seção). Após a obtenção das preparações e tecidos, os animais foram fixados em formaldeído 5%, conservados em etanol 70% e posteriormente depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, São Paulo, Brasil, sob os vouchers LG 13462, 13463, 13464, 13465, 13467, 13484, 17992, 17993, 17994, 17995, 17997 e 17998 (BR) e LG 13310, 13312, 13321 e 13322 (CN).

Tabela 1 - Localidade de coleta, código e número de indivíduos por sexo de *C. modestus* analisados no presente estudo.

Localidade	Código	Indivíduos por sexo
Córrego Campo Novo (Bauru), Bacia do Rio Tietê 22°23'28.6"S 49°01'15.6"W	CN	(01♀; 01♂; 02-)
Rio Batalha (Bauru), Bacia do Rio Tietê 22°23'40.2"S 49°06'35.2"W	BR	(02; ♀05♂; 5-)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: ♀: Fêmeas; ♂: Machos; -: não identificados.

3.2 Estimulação de mitoses e obtenção de cromossomos metafásicos

A estimulação de mitoses foi realizada utilizando fermento biológico, aplicado na musculatura dorsolateral dos animais, conforme o protocolo estabelecido por Oliveira et al. (1988), seguindo os seguintes passos:

1. Preparação de fermento biológico (Fleischmann) na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7mL de água destilada.

2. Incubação da solução a 37°C por 20 minutos.
3. Injeção da solução na região dorsolateral dos animais, com 1mL para cada 100g de peso do indivíduo.
4. Manutenção dos indivíduos em aquário bem oxigenado a 28°C.

Seguindo o protocolo de Foresti et al. (1981), a obtenção de cromossomos metafásicos foi realizada 48 horas após a estimulação de mitose, utilizando colchicina para inibir a polimerização dos microtúbulos e subsequentemente hipotonizando as células em suspensão, finalizando com a fixação em uma solução de metanol e ácido acético na proporção 3:1. Os detalhes desta etapa são:

1. Administrar solução aquosa de colchicina (0,025%) na região ântero-medial, abaixo da nadadeira peitoral, na proporção de 1mL para cada 100g de peso do animal.
2. Manter o animal em um aquário oxigenado por 50 minutos.
3. Induzir a morte dos animais por imersão em solução de benzocaína e coletar o rim anterior. Transferir o material para uma placa de Petri contendo 7mL de solução hipotônica de KCl (0,075M).
4. Dissociar o material utilizando pinças de dissecação e uma seringa de 3mL, resultando em uma solução homogênea.
5. Transferir a solução para um tubo de centrifuga e incubar a 37°C por 21 minutos.
6. Remover o tubo da estufa, adicionar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1) e agitar suavemente com uma pipeta Pasteur. Deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente.
7. Adicionar 6mL de fixador à mistura, agitando sem formar bolhas, e centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
8. Descartar o sobrenadante e adicionar 7mL de fixador ao material precipitado, centrifugando por mais 7 minutos a 1200 rpm.

9. Repetir o passo 8 duas ou três vezes para uma fixação completa das células em suspensão.

3.3 Caracterização da heterocromatina constitutiva

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972) com algumas modificações, que consistiu em:

1. Hidrolisar o material contido nas lâminas por 25 minutos em HCl 0,2N a temperatura ambiente. Posteriormente lavar com água destilada;
2. Passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 8 segundos a 60 °C.
3. Logo após lavar com água destilada;
4. Mergulhar em HCl 1N a 60°C e então lavar novamente com água destilada;
5. Incubar por 25 minutos em 2xSSC (pH=6,8) a 60 °C e lavar com água destilada;
6. Corar por aproximadamente 15 minutos com Giemsa a 0,5% em tampão fosfato (pH=6,7).

3.4 Microscopia e processamento de imagens

Foram analisadas, no mínimo, 20 metáfases espalhadas por indivíduo para determinar o número diplóide (2n), a estrutura cariotípica, a presença ou ausência de cromossomos B e os resultados de FISH. As imagens foram capturadas com um microscópio Axioplan II (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e processadas com o software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os cromossomos foram classificados de acordo com as proporções dos braços em: metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) ou acrocêntrico (a) (Levan et al., 1964).

3.5 Sequenciamento das leituras curtas

Para a obtenção de leituras curtas para os estudos de bioinformática, foi extraído DNA genômico de dois indivíduos de *C. modestus*, seguindo as recomendações do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Um dos indivíduos era portador de três cromossomos B, denominado 3B neste trabalho, e o outro não possuía cromossomos extranumerários, denominado 0B. Após a extração,

a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando *ladder* (Low DNA mass Ladder – Invitrogen) de 100pb e corante *blue juice* 10x (Gel Loading Buffer – Invitrogen) e gel *red* 10x (GelRed Nucleic Acid Gel Stain (2,5 µL/ mL).

O sequenciamento dos indivíduos foi realizado pela empresa BGI, gerando leituras curtas BGISEQ-500 (*paired-end* 2x100 pares de bases) para o indivíduo 3B e (*paired-end* 2x150 pb) para o indivíduo 0B. O tamanho do sequenciamento foi de 1.64 Gb para o indivíduo 3B e 1.22 Gb para o indivíduo 0B. Todas as leituras foram depositadas no Sequence Read Archive (SRA) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), com os códigos de acesso SRR26178311 e SRR26178312.

3.6 Análises bioinformáticas em servidor remoto e protocolos de bioinformática

As análises de bioinformática foram realizadas remotamente através de um servidor de alta capacidade que está localizado no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, sob os cuidados do Prof. Dr. Claudio de Oliveira.

As bibliotecas passaram por teste de qualidade de suas leituras e retiradas de todas as leituras menores que 100 pb, utilizando o software Trimmomatic (Bolger et al., 2014), a fim de padronizar as análises seguintes. O catálogo de DNA satélite, conhecidos como satelitoma, de cada amostra foram caracterizados de forma independente através de múltiplas iterações da ferramenta TAREAN (Novák et al., 2017) e satMiner (Ruiz-Ruano et al., 2016). Para cada iteração, usamos uma subamostra de 2×500.000 leituras, seguida pela filtragem das sequências consideradas satDNAs pelo TAREAN, chamadas de “*clusters high e low confidence*”, nas bibliotecas genômicas usando DeconSeq (Schmieder e Edwards, 2011) até que nenhum outro satDNA fosse caracterizado. Após esta caracterização inicial, identificamos e excluimos outras sequências repetidas em tandem, como famílias multigênicas, e unificamos ambos os catálogos em um único, removendo satDNAs idênticos. Em seguida, realizamos uma busca por similaridade usando o software RepeatMasker (https://github.com/fjruiRuano/satminer/blob/master/rm_homology.py), a fim de categorizar os satDNAs de acordo com seus níveis de similaridade de

monômeros, como segue: mesma variante de satDNA (similaridade acima de 95%), variantes de satDNA (similaridade entre 80% e 95%) e superfamília (similaridade entre 50% e 80%), seguindo os critérios estabelecidos por Ruiz-Ruano et al. (2016).

O estudo de abundância de divergência de cada DNA satélite em cada biblioteca foi realizado independentemente com o programa *RepeatMasker*, utilizando o *script* (acessado em 10 de outubro de 2022), utilizando, randomicamente o total de 10.000.000 leituras para cada biblioteca (2 x 5.000.000). Para um estudo de abundância relativa de cada satDNA em cada indivíduo, foi realizado o quociente entre as leituras mapeadas e o número de nucleotídeos analisados. Utilizando a abundância de cada DNA satélite no indivíduo 3B, nomeamos os satDNAs conforme a ordem decrescente de suas abundâncias, ou seja, com o DNA satélite mais abundante sendo o primeiro DNA satélite da espécie (CmoSat01-192), seguindo a regra de nomenclatura realizada por Ruiz-Ruano (2016). O quociente entre a abundância relativa de cada satDNA em um indivíduo 3B com um 0B foi calculado para o estudo de abundância diferencial entre indivíduo portador e não portador de cromossomo B, para a busca por supostas sequências agrupadas nos cromossomos B da espécie em questão.

Considerando nossas análises *in silico* e resultados de FISH (Figura 8), três satDNAs foram agrupados nos cromossomos B (CmoSat01-192, CmoSat02-108 e CmoSat58-47). Destes, selecionamos CmoSat58-47 para uma análise de diversidade intra e intergenômica a fim de obter scores detalhados e confiáveis de abundância dos haplótipos nas duas bibliotecas genômicas. O principal motivo do foco ser este satDNA é o tamanho de seu monômero, sendo mais curto que as leituras das bibliotecas, possibilitando um estudo mais preciso. Para isso, subamostramos ambas as bibliotecas para 1.000.000 leituras e alinhamos com um dímero do satDNA usando *RepeatMasker*. Em seguida, extraímos as leituras alinhadas, mapeamos-as contra este dímero com *Bowtie2* (Langmead e Salzberg 2012) e isolamos a região central correspondente a um único monômero. Para evitar vieses introduzidos por erros de sequenciamento, removemos todos os monômeros que foram representados apenas uma vez, usando um *script* em python personalizado (https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols/blob/master/cd_hit_filter_size.py). Em seguida, alinhamos o conjunto de dados resultante com *MUSCLE* (Edgar 2004) e as análises de diversidade de DNA foram realizadas com *DnaSP 6 - DNA Sequence Polymorphism* um software utilizado para a análise de polimorfismos de DNA através

de dados de um único locus ou de vários loci que pode estimar diversas medidas de variação da sequência de DNA dentro e entre populações em locais não codificantes (Rozas et al., 2017). Geramos uma árvore de extensão mínima (MST) com base nas diferenças entre os haplótipos encontrados para o estudo de abundância de cada um destes, utilizando o software PHYLOViZ 2.0 (Nascimento et al. 2017).

3.7 Desenho de primers e Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os *Primers* foram desenhados para obtenção das sondas para a FISH com os seguintes critérios: (i) dez satDNAs mais abundantes; (ii) todos os satDNAs exibindo razões de abundância 3B/0B maiores que 2; e (iii) satDNAs exibindo razões de abundância 3B/0B inferiores a 0,5. Exceções foram feitas para satDNAs com tamanhos de monômeros menores que 40 pb e os satDNAs menos abundantes (abaixo de CmoSat100). No total, foram desenhados 19 pares de primers (Tabela Suplementar 2). Para o desenho dos *primers* foram utilizados em conjunto uma calculadora online de propriedades de oligonucleotídeos (OligoCalc) disponível no site <http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> e o *Multiple Primer Analyzer* da ThermoFisher Scientific, disponível no site <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>, para checar autoanelamentos, temperatura de anelamento e analisar e comparar múltiplos *primers* simultaneamente.

Cada satDNA foi submetido à PCR sob os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento entre 52 °C a 60 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para confirmar a amplificação e garantir a consistência dos resultados, os produtos de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Por fim, os produtos foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Branchburg, NJ, EUA).

3.8 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

As sequências isoladas a partir dos PCRs dos satDNAs foram marcadas com Atto550-dUTP (vermelho), Atto488-dUTP (verde), Atto425-dUTP (ciano) ou Atto680-dUTP (amarelo) por Nick-Translation (Jena Biosciences, Jena, Alemanha) e utilizadas em ensaios de Hibridização *in situ* Fluorescente. Todos os satDNAs mencionados (denominados como CmoSatDNAs) foram hibridizados em indivíduos sem B (população CN), portadores de 1B e portadores de 3B (população BR). As soluções de hibridização foram compostas por 100 ng de cada sonda marcada mais 50% de formamida, 2xSSC, 10% de SDS, 10% de sulfato de dextrano e tampão de Denhardt em pH 7,0 em um volume total de 20 µl, seguindo condições de alta estrigência (Yano et al., 2017). Lâminas contendo cromossomos em metáfase foram envelhecidas por 1 h a 60 °C, após tratamento a 37 °C por 5 min com solução de pepsina a 0,005% (99 µl de H₂O, 10 µl de HCl e 2,5 µl de pepsina (20 mg/ml)). Os cromossomos foram desnaturados em Formamida 70%/2xSSC a 72°C por 3 min, enquanto as sondas foram desnaturadas a 85°C por 10 min, depois resfriadas a 4°C por 2 min antes da aplicação. A hibridização ocorreu em um período de, no mínimo, 12 horas em câmara úmida a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 min em 1xSSC a 65°C e 4xSSC/Tween em temperatura ambiente, após uma lavagem rápida em 1xPBS por 1 min. As lâminas foram desidratadas sucessivamente em etanol (70%, 85% e 100%), antes da coloração dos cromossomos com DAPI montado em Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, EUA).

Apenas no indivíduo 5B foi utilizada somente a sonda do CmoSat58 marcada por digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR. A FISH foi realizada através do método descrito por Pinkel et al (1986) (com algumas modificações). Os cromossomos foram tratados com Pepsina 0,005%/HCl 10 mM por 5 min, fixados em formaldeído 1% em 1x PBS/MgCl₂ 50 mM por 10 min e desidratados em série de etanol (70%, 80% e 100%) por 3 min cada. Em seguida, o DNA cromossômico foi desnaturado em formamida a 70%/2x SSC por 2 min a 70 °C. Para cada lâmina, 30 µL de solução de hibridização contendo 200 ng da sonda marcada, 50% de formamida, 2x SSC e 10% de sulfato de dextrano foram desnaturados por 10 min a 95 °C, colocados nas lâminas e hibridizados *overnight* a 37 °C em câmara úmida. Após a hibridização, foi realizada uma lavagem de 0,1x SSC a 42°C durante 5 min, seguida de uma etapa de bloqueio, lavagens com 4x SSC/0.5% Tween por 9 min e por fim desidratados em série de etanol (70%, 80% e 100%) por 3 min cada. A detecção da sonda foi realizada com antidigoxigenina-rodamina e os cromossomos

foram contrastados com DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio óptico (Olympus BX61) com software DP Control (Olympus®, Hamburgo, Alemanha).

3.9 Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

Para realizar a técnica de Hibridização Genômica Comparativa, comparamos os genomas de indivíduos sem cromossomo B (CN) e com um cromossomo B (BR) com os de indivíduos portadores de três cromossomos B (BR). O DNA genômico (gDNA) de todos os indivíduos foi extraído conforme descrito anteriormente e marcado com fluorocromos específicos: verde (Atto488-dUTP), ciano (Atto425-dUTP) e vermelho (Atto550-dUTP), utilizando o kit de Nick Translation (Jena Bioscience).

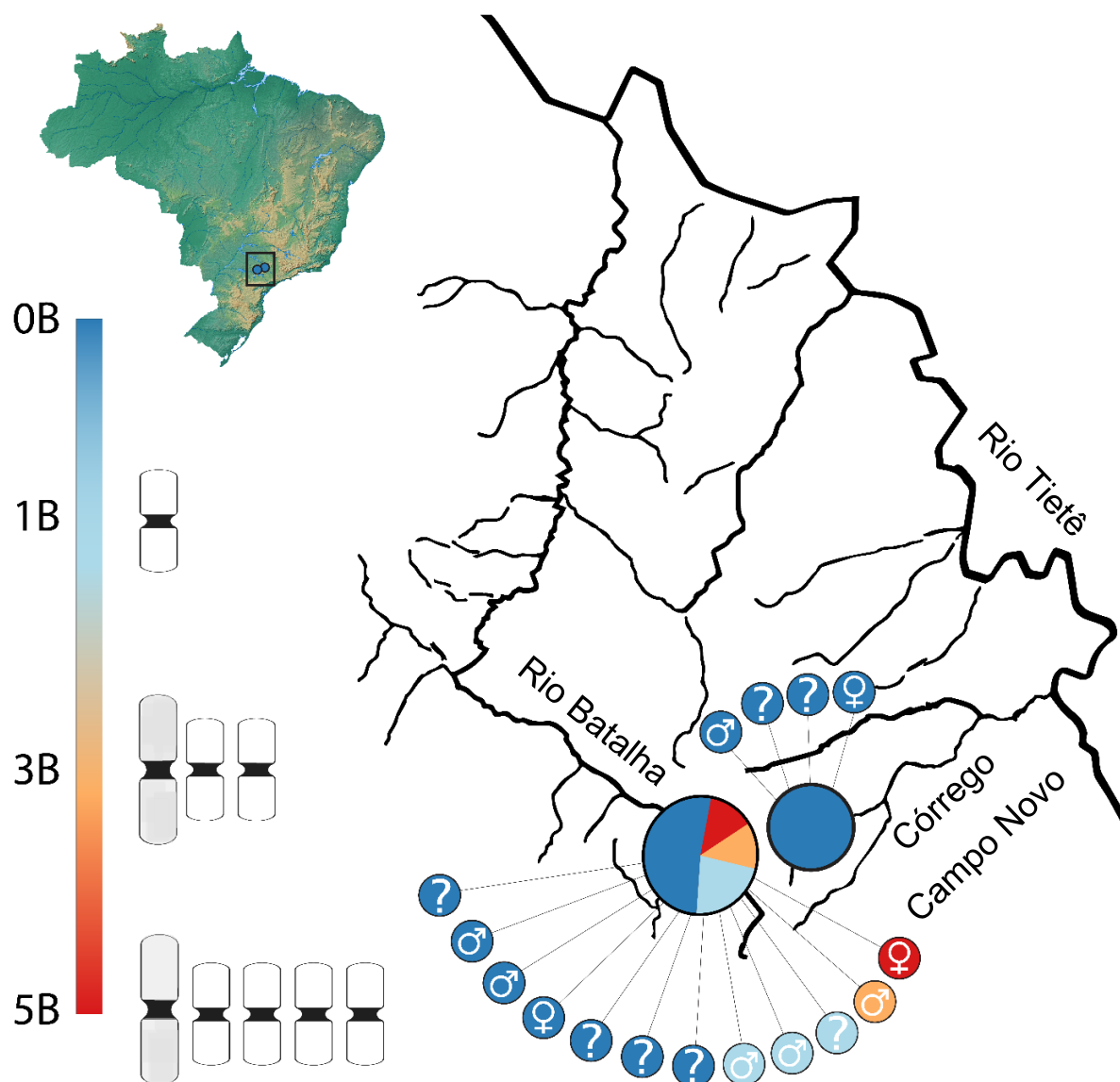
O mix de hibridização consistiu em 500 ng de gDNA de cada indivíduo e 10 µg de DNA C0t-1, obtido por DOP-PCR, de cada indivíduo (Yang e Graphodatsky, 2009). As sondas foram co-hibridizadas nos cromossomos do indivíduo com três cromossomos B, seguindo o protocolo de Sassi et al. (2022), com adaptações na proporção sonda/DNA C0t-1 baseadas em estudos anteriores com peixes (Sember et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Moraes et al., 2021).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Citogenética

Os espécimes de *C. modestus* das duas populações analisadas exibiram um número diploide (2n) de 54, com um cariótipo composto exclusivamente por cromossomos biarmados, sem polimorfismos relacionados ao sexo (Figura 3). Além disso, cinco dos doze indivíduos da população BR possuíam pequenos cromossomos supranumerários (Figura 2, Tabela 1), sendo três indivíduos portadores de um cromossomo B, um indivíduo portador de três cromossomos B e um indivíduo portador de cinco cromossomos B.

Figura 2. Mapa destacando os locais de coleta e a distribuição dos indivíduos portadores de cromossomos B.



Legenda: Os círculos indicam os pontos amostrais (BR e CN em azul) no mapa do Brasil. Os círculos menores representam cada indivíduo coletado, conforme Tabela 1. O gradiente de cor indica o número e a variante de cromossomos B por célula em cada indivíduo investigado. O cromossomo em cinza mostra a variante heterocromática.

Após a realização do bandeamento C, foram identificadas pelo menos duas variantes de cromossomos B nesta população: i) um cromossomo pequeno metacêntrico com bandeamento C positivo (referido como B_h) e ii) um cromossomo ainda menor negativo para bandeamento C (referido como B_e) (Figura 3).

Na população CN, não foi observado nenhum indivíduo portador de cromossomos B.



Figura 3. Cariótipo de *C. modestus* (população BR) portador de três cromossomos B.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Em (a) cromossomos após coloração convencional com Giemsa e (b) bandamento-C. As variantes B_h e B_e estão destacadas, assim como suas respectivas morfologias e o padrão de heterocromatina constitutiva. Escala = 5 µm.

4.2 Caracterização e análise do Satelitoma

A análise *in silico* revelou um catálogo de 116 satDNAs em *C. modestus* (Tabela Suplementar 1), depositados no NCBI-Genbank sob os números de acesso OR604368 - OR604483, entre eles 19 foram selecionados para a síntese de *primers*. A busca por homologia revelou a existência de 10 superfamílias nesta espécie (Tabela Suplementar 1). O tamanho das unidades de repetição variou de 16 a 2.520 pb com uma mediana de 252,6 pb. Este catálogo foi predominantemente composto por satDNAs longos (> 100 pb) e ricos em A+T, com um conteúdo médio de 54,8%, sendo que apenas 20 satélites apresentaram conteúdo A+T inferior a 50% (Tabela Suplementar 2).

Os valores de abundância dos satDNAs foram similares nas duas populações, exceto pelo CmoSat58, que apresentou uma abundância 34 vezes maior na biblioteca genômica do indivíduo da população BR, possivelmente devido ao fato de este ser um indivíduo 3B (Tabela 2).

Tabela 2. Principais características de CmoSatDNAs amplificados por PCR e usados para experimentos de FISH.

Famílias de satDNA	A+T (%)	Abundância 3B	Abundância a 0B	Abundância 3B/0B	Divergência a 0B	Divergência 3B
CmoSat01-192	64.1	0.015	0.013	1.18	5.61	5.7
CmoSat02-108	52.8	0.014	0.013	1.05	12.75	12.63
CmoSat03-74	52.7	0.007	0.008	0.89	7.42	7.78
CmoSat04-187	64.7	0.007	0.004	1.90	6.89	7.01
CmoSat06-317	57.7	0.002	0.002	1.18	4.7	4.68
CmoSat07-191	59.2	0.002	0.002	1.16	8.17	8.3
CmoSat09-772	58.9	0.002	0.002	0.99	8.35	8.31
CmoSat11-64	53.1	0.002	0.002	0.72	6.21	6.41
CmoSat31-66	60.6	5.02E-04	2.96E-04	1.70	10.52	10.36
CmoSat36-182	50.5	3.72E-04	1.74E-04	2.14	5.84	5.97
CmoSat37-43	30.2	3.68E-04	9.22E-04	0.40	8.76	8.69
CmoSat52-183	57.4	2.43E-04	4.40E-05	5.53	7.39	4.27
CmoSat53-56	53.6	2.30E-04	9.95E-05	2.31	11.07	4.91
CmoSat56-166	51.2	2.08E-04	5.64E-04	0.37	6.47	8.96
CmoSat58-47	44.7	1.90E-04	5.56E-06	34.14	4.93	3.28
CmoSat67-140	47.9	1.53E-04	6.80E-05	2.25	3.86	3.7

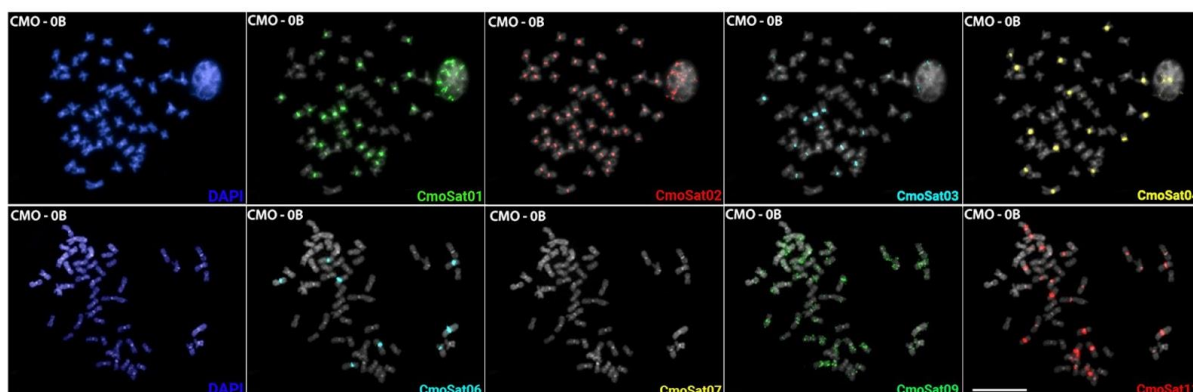
Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3 Distribuição cromossômica dos CmoSatDNA

Dentre os 19 CmoSatDNAs selecionados (Tabela Suplementar 2), 16 foram amplificados com sucesso por PCR e mapeados fisicamente por meio dos experimentos de FISH (Tabela 2). Os indivíduos de ambas as populações (BR e CN) apresentaram padrões similares de distribuição dos satDNAs nos cromossomos A. A maioria dos CmoSatDNAs foi distribuída nas regiões pericentroméricas ou teloméricas

dos cromossomos, exceto pelo CmoSat07, que não apresentou sinais positivos, e pelo CmoSat58, que não apresentou marcação em nenhum cromossomo A (Figuras 4 e 5; Figuras 6, 7 e 8).

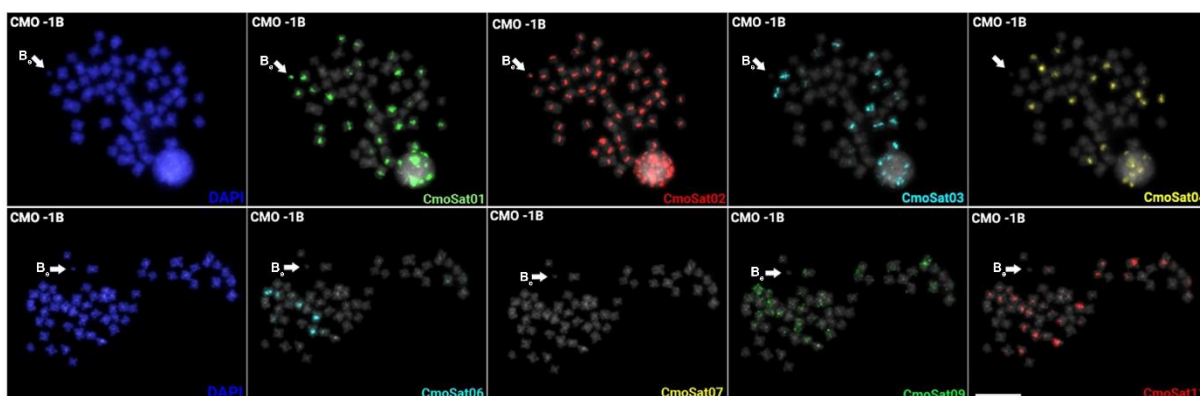
Figura 4: Metáfase mitótica de *C. modestus* 0B evidenciando a localização cromossômica dos CmoSatDNAs.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Os nomes das famílias de satDNA estão indicados no canto inferior direito, em vermelho (marcado com Atto550), verde (marcado com Atto488), ciano (marcado com Atto425) ou amarelo (marcado com Atto680). Escala = 5µm.

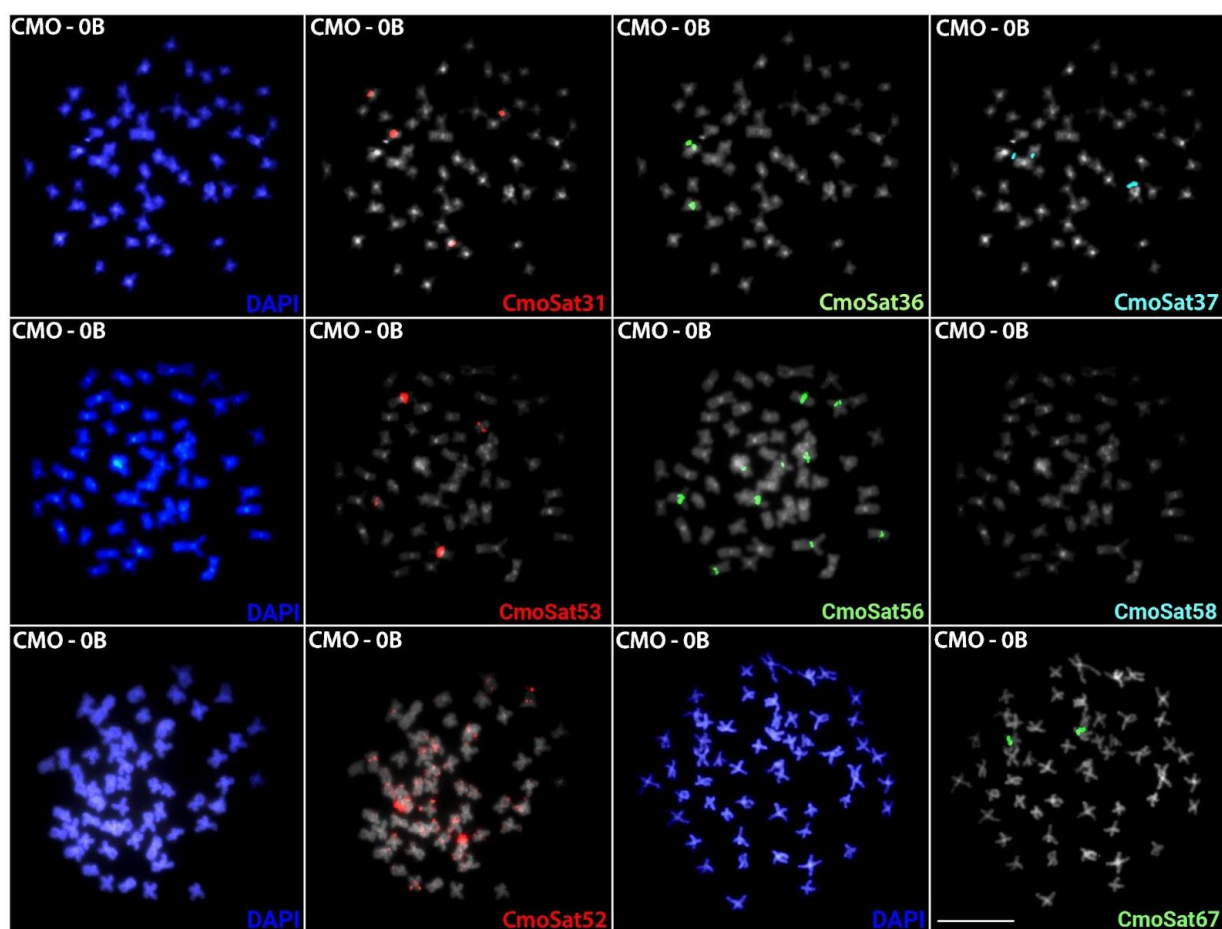
Figura 5. Metáfases de *C. modestus* portador de 1B_e após FISH evidenciando a localização cromossomal dos CmoSatDNAs.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Os nomes das famílias de satDNA estão indicados na parte inferior direita, em vermelho (marcação Atto550), verde (marcação Atto488), ciano (marcação Atto425), ou amarelo (marcação Atto680). As setas indicam os cromossomos B. Escala = 5µm.

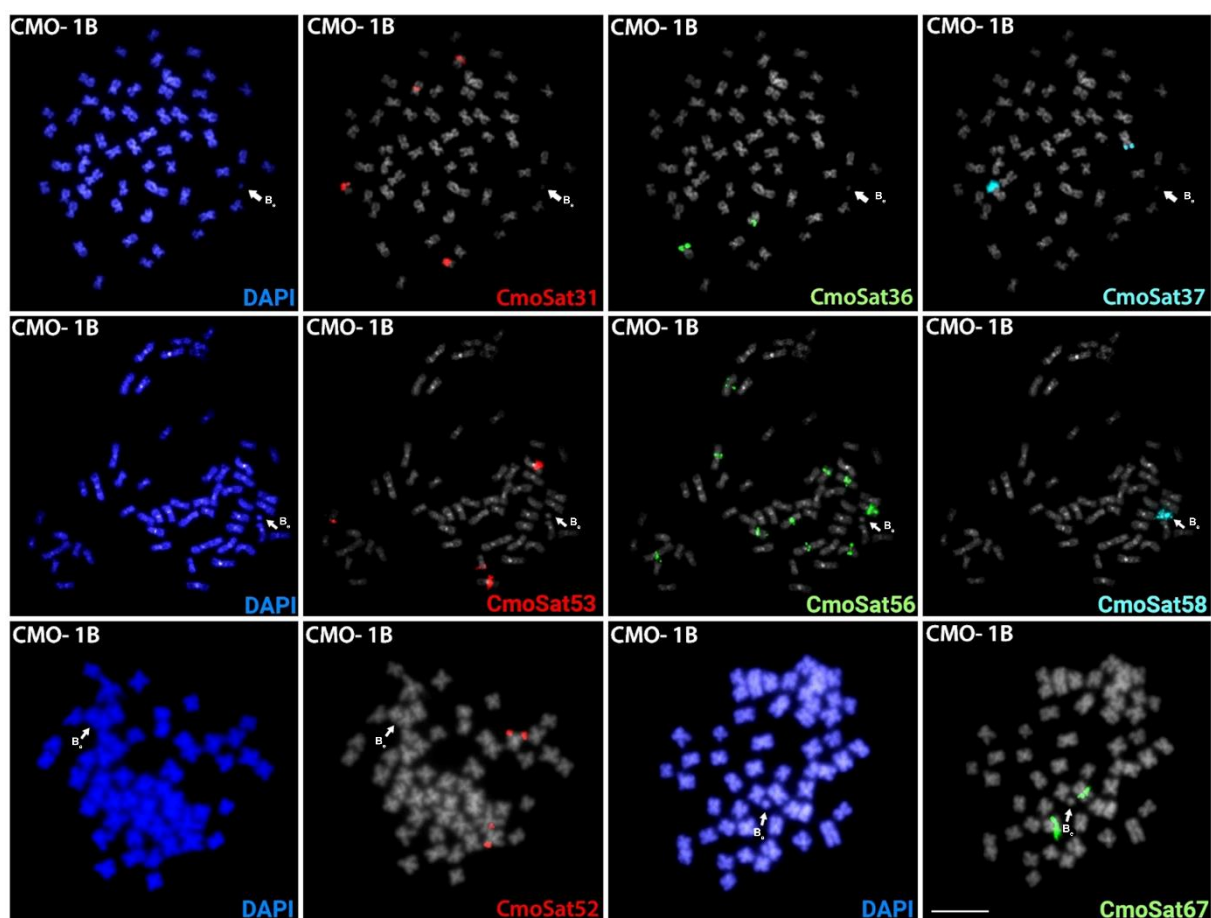
Figura 6. Metáfase mitótica de *C. modestus* 0B evidenciando a localização cromossomal dos CmoSatDNAs.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Os nomes das famílias de satDNA estão indicados no canto inferior direito, em vermelho (marcado com Atto550), verde (marcado com Atto488), ou ciano (marcado com Atto425). Escala = 5µm.

Figura 7. Metáfases de *C. modestus* portador de 1B_e evidenciando a localização cromossomal dos satDNAs.



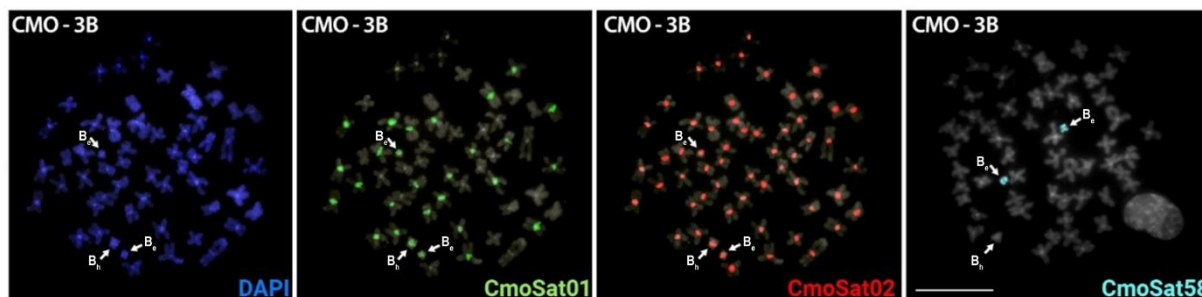
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Os nomes das famílias de satDNA estão indicados na parte inferior direita, em vermelho (Atto550), verde (Atto488), ou ciano (Atto425). Os cromossomos B estão indicados. Escala = 5µm.

Em relação aos indivíduos da população BR e aos cromossomos B, tanto B_h quanto B_e exibiram sinais para CmoSat01 e CmoSat02, enquanto CmoSat58 foi mapeado exclusivamente em B_e (Figuras 5, 7, 8 e 9).

Considerando nossas análises *in silico* e resultados de FISH (Figura 8), três satDNAs foram agrupados nos cromossomos B (CmoSat01-192, CmoSat02-108 e CmoSat58-47). Destes, selecionamos CmoSat58-47 para uma análise de diversidade intra e intergenômica a fim de obter scores detalhados e confiáveis de abundância dos haplótipos nas duas bibliotecas genômicas.

Figura 8. Metáfase de *C. modestus* portador de 3B_{h,e} evidenciando a localização cromossomal dos dois mais abundantes e mais diferenciais satDNA mapeadas no cromossomo B_e do portador - 1B_e.

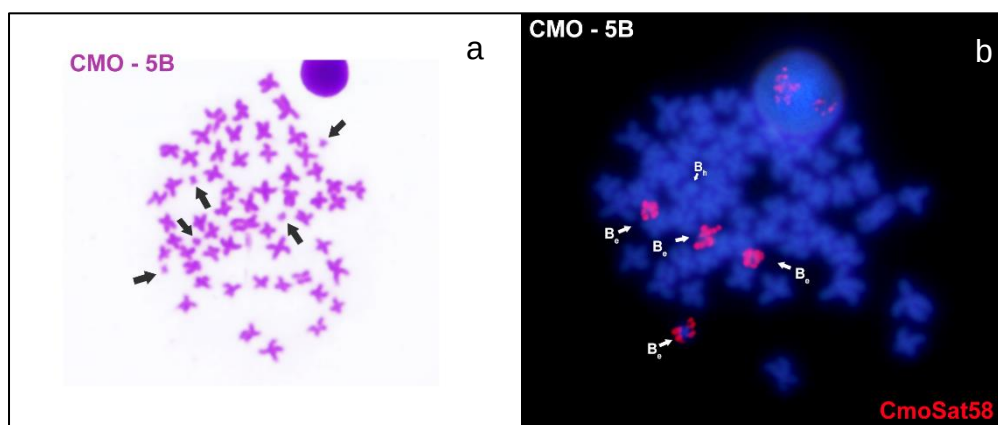


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: O nome das famílias de satDNA estão indicados na parte inferior direita, em vermelho (marcado com Atto550), verde (marcado com Atto488), ou ciano (marcado com Atto425). Os cromossomos B estão indicados. Escala = 5 μ m.

Em relação ao indivíduo 5B da população BR, o CmoSat58 também foi mapeado exclusivamente em B_e (Figura 9).

Figura 9. Metáfase de *C. modestus* portador de 5B_{h,e} (BR).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: Em (a) corado em Giemsa e (b) FISH evidenciando distribuição do satDNA mais diferencial mapeado no cromossomo B_e. O nome da família de satDNA está indicado na parte inferior direita, em vermelho (marcado com digoxigenina-11-dUTP).

4.4 Divergência intra e intergenômica

Os resultados da diversidade intra- e intergenômica do CmoSat58 foram consistentes entre os dados de abundância geral obtidos por RepeatMasker e FISH, mostrando aproximadamente dez vezes mais monômeros e cinco vezes mais haplótipos na biblioteca genômica 3B em comparação com a biblioteca do indivíduo

sem cromossomos B (Tabela 3). A maior diversidade de haplótipos também foi observada no indivíduo 3B, o que provavelmente está relacionado à diversificação dos monômeros dentro do cromossomo B.

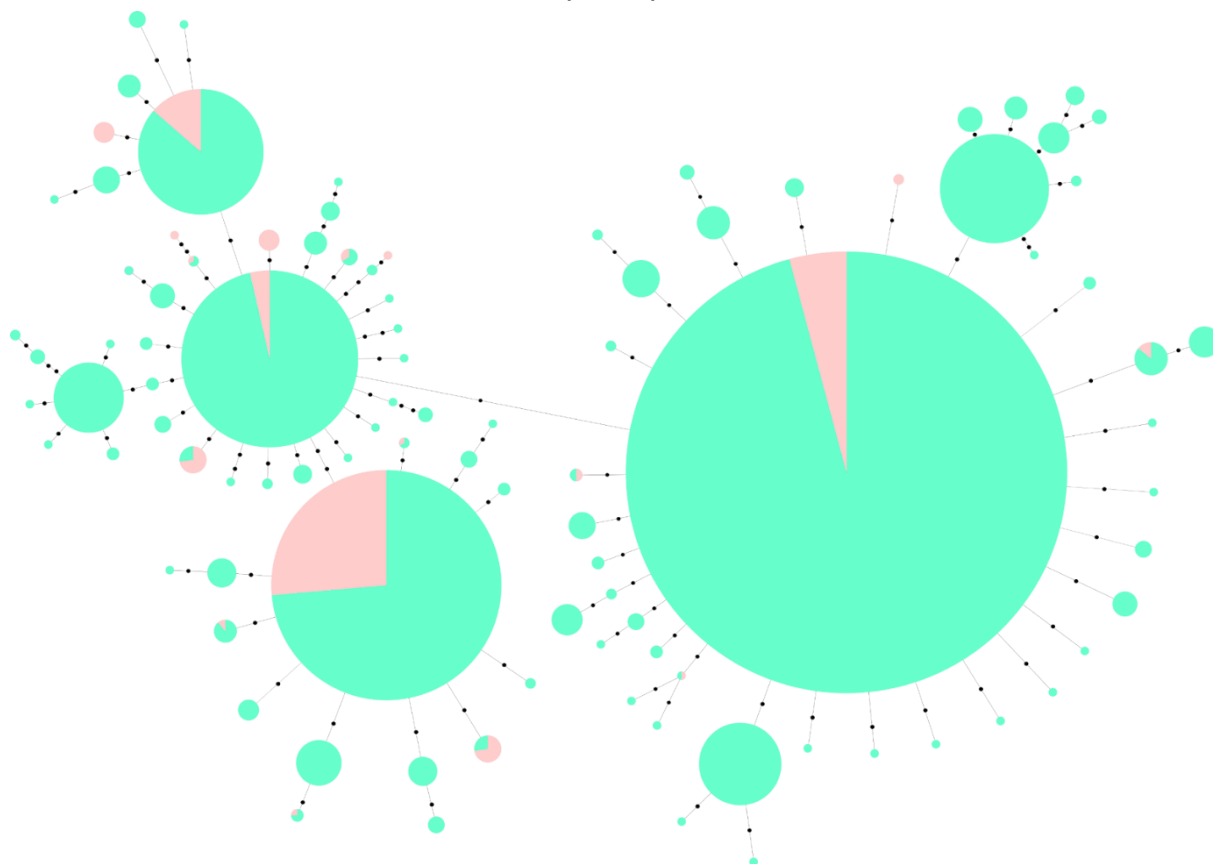
Tabela 3. Variação genética do CmoSat58-47 obtida através dados brutos com leituras curtas.

satDNA	Amostra	N	Hap	Hd	π
CmoSat58	0B	99	19	0.878 ± 0.022	0.045
	3B	974	93	0.931 ± 0.005	0.053
	Total	1073	98	0.934 ± 0.004	0.053

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Legenda: **N** = número de sequências, **Hap** = número de haplótipos, **Hd** = diversidade de haplótipos, π = diversidade de nucleotídeos.

Figura 10. MSTs linear de CmoSat58 obtida a partir *reads* do 0B (vermelho) e do 3B (verde).



Fonte: Elaborada pelo Autor.

Legenda: O diâmetro do círculo é proporcional a abundância do haplótipo. Os números representam o número de etapas mutacionais, enquanto os círculos pretos representam 01 par de base de divergência entre os haplótipos.

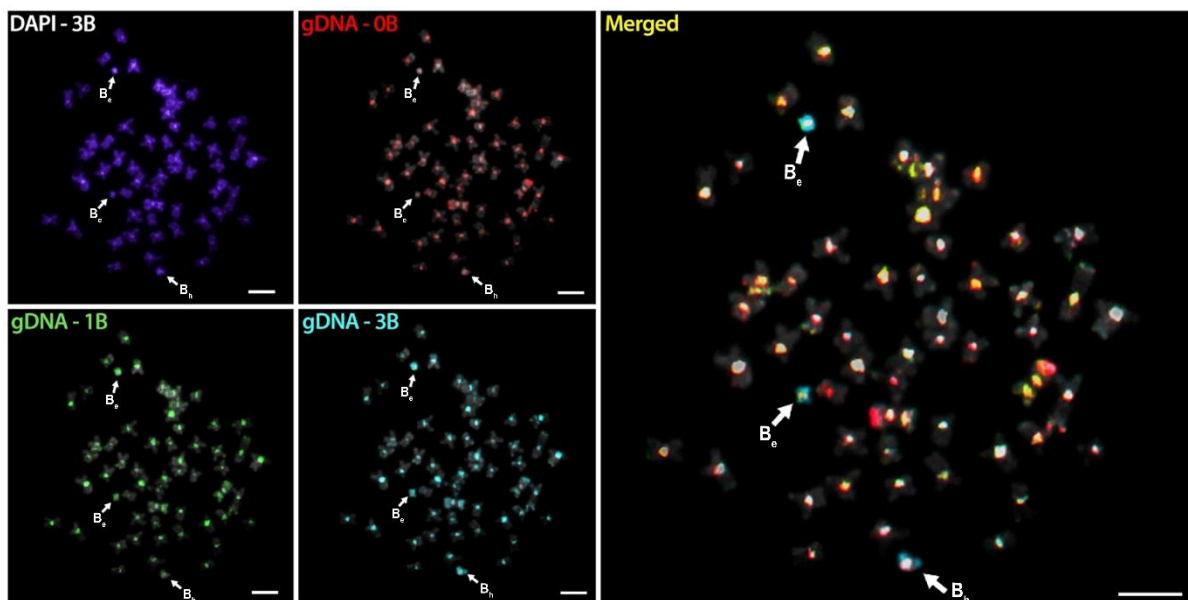
4.5 Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

As investigações de CGH comparando o genoma de *C. modestus* entre indivíduos portadores de 1B_e, 3B_{h,e} e não portadores de B demonstraram uma alta compartimentalização de DNA, com uma variedade de sinais específicos de variantes não sobrepostos (Figura 11). Os indivíduos não portadores de B (população CN) apresentaram arranjos variante-específicos mais evidentes em comparação aos da população BR.

Em relação aos cromossomos B, a sonda do indivíduo 0B hibridizou nas regiões centroméricas de B_h e B_e, provavelmente nas mesmas regiões onde CmoSat01 e CmoSat02 estão localizados. O genoma do portador de 1B_e hibridizou completamente ao longo de todo B_e, mas não ao longo de B_h. Finalmente, a sonda do

portador de 3B_{h,e} hibridizou completamente em B_h, indicando que o conteúdo genômico das variantes de B nesta espécie é consideravelmente diferente.

Figura 11. Metáfase mitótica de *C. modestus* portador 3B_{h,e} após hibridização genômica comparativa intraespecífica (CGH).



Fonte: Elaborada pelo Autor.

Legenda: Cromossomos marcados com sondas derivadas do genoma do portador 1B_e (verde); portador 3B_{h,e} (azul claro) e não portador de B (vermelho). A imagem mesclada contém todas as três sondas genômicas e contra coloração DAPI. As setas indicam os cromossomos B. Escala = 10 µm

As adaptações utilizadas permitiram uma hibridização mais eficiente e precisa, destacando as diferenças genômicas entre os indivíduos com diferentes números de cromossomos B.

5 DISCUSSÃO

A diversificação de variantes já foi descrita em outras populações de *C. modestus* e corresponde aos resultados obtidos aqui (Santos et al., 2008). Além disso, nossas descobertas complementam dados sobre populações de *C. modestus* com cromossomos B das bacias do Tietê (Venere e Galetti, 1985), Piracicaba (Venere e Galetti, 1989), Tibagi (Martins et al., 1996) e Paranapanema (Rosa Santos et al., 2008).

Os cromossomos supranumerários são elementos enigmáticos amplamente investigados através de técnicas de citogenética clássica e molecular para elucidar sua origem e evolução. Neste estudo, demonstramos a ocorrência de duas variantes

B (B_h e B_e) em uma população da espécie de peixe *C. modestus*, que provavelmente surgiram intraespecificamente e seguiram caminhos evolutivos divergentes. Essas variantes diferenciam-se em tamanho (B_h grande e B_e pequeno), padrões de heterocromatina C e no acúmulo de sequências repetitivas (Figuras 3, 5-9 e 11).

Ambas as populações compartilham dois satDNAs presentes em vários (CmoSat01) ou em todos os centrômeros do complemento A (CmoSat02) (Figuras 4, 5 e 8). Em espécies monocêntricas, alguns satDNAs podem estar associados aos centrômeros e desempenhar um papel importante na segregação dos cromossomos durante o ciclo celular (Hartley e O'Neill, 2019; Talbert e Henikoff, 2020).

Foi descoberto que o genoma de *C. modestus* inclui 116 sequências de satélites (Tabela Suplementar 1). Como evidenciado por outros estudos (Utsunomia et al., 2019; Goes et al., 2023; Moraes et al., 2023), esse grande número de famílias de DNAs satélites não é exclusivo desta espécie, já tendo sido reportado em outras espécies da ordem Characiformes, em comparação com aves, insetos ou répteis (Utsunomia et al., 2019; Stornioli et al., 2021; Sales-Oliveira et al., 2024; De Oliveira et al., 2024; Kretschmer et al., 2024).

Embora todos os CmoSatDNAs tenham sido identificados em ambas as bibliotecas sequenciadas, a biblioteca 3B apresentou maior abundância relativa de alguns desses satélites (Tabela S1). Notavelmente, o CmoSat58 foi o único mapeado exclusivamente na variante B_e presente em indivíduos 1B, 3B e 5B (Figuras 7, 8 e 9). A distribuição da MST indica a existência de haplótipos exclusivos de B, embora não sejam os mais abundantes (Figura 10). A amplificação do satDNA nos cromossomos B pode ser resultado de transposição preferencial ou erros nos mecanismos de reparo do DNA (Trifonov et al., 2013; Montiel et al., 2014). As sequências compartilhadas entre os cromossomos A e B podem estar relacionadas à origem desses elementos acessórios, possivelmente formadas por uma estrutura em mosaico de segmentos duplicados de material genético (Trifonov et al., 2010).

A maioria dos CmoSatDNAs encontrados nos cromossomos B de *C. modestus* tem uma grande fração de nucleotídeos A+T, característica inerente dos satDNAs com alto conteúdo de A+T (Urdampilleta et al., 2009). Estudos mostram que uma alta proporção de A+T auxilia na curvatura do DNA necessária para formar regiões heterocromáticas (Makova e Hardison, 2015). Essas regiões desempenham um papel na estabilidade física do genoma e são portadoras de RNAs não codificantes

envolvidos no envelhecimento celular, resposta ao estresse e alterações epigenéticas (Wang et al., 2016).

A segunda etapa envolveu o mapeamento *in situ* de um subconjunto desses satélites (descritos na Tabela Suplementar 1) em indivíduos 0B, 1B e 3B e 5B da população BR. Apenas três CmoSatDNAs (CmoSat01, CmoSat02 e CmoSat58) foram marcados nos cromossomos B, sendo CmoSat58 exclusivo da variante B_e (Figuras 7, 8 e 9).

Investigações sobre o conteúdo das sequências de satélites dos cromossomos B mostraram que os cromossomos B eucromáticos têm uma distribuição de sequências repetidas, enquanto a maioria dos cromossomos B heterocromáticos é rica em sequências de satélites, incluindo algumas específicas de cromossomos B (Ruiz-Ruano et al., 2017; Serrano-Freitas et al., 2020; Stornioli et al., 2021). A falta de satDNAs específicos de B para B_h em *C. modestus* pode sugerir uma origem recente devido ao seu baixo nível de diferenciação (Camacho et al., 2021).

Em espécies com cromossomos B, a presença de um cromossomo extra no cariótipo não altera a quantidade de heterocromatina do genoma, sugerindo um mecanismo de compensação entre os cromossomos A e B (Chumová et al., 2016; Barbosa et al., 2021). A distribuição da heterocromatina nos espécimes de *C. modestus* é restrita à região centromérica de poucos pares de cromossomos, contrastando com outras populações da mesma espécie que apresentam bandas C fortes em alguns telômeros e centrômeros (Venere et al., 2008). Os cromossomos B de *C. modestus* possuem diferentes composições de heterocromatina: a variante B_h é heterocromática, enquanto a variante B_e é eucromática e não apresenta grande acúmulo de heterocromatina (Figura 3). DNAs satélites podem alterar a estrutura nuclear e as propriedades físicas da heterocromatina, fundamentais para a segregação cromossômica adequada (Novo et al., 2022). Tanto CmoSat01 quanto CmoSat02 foram mapeados na região centromérica da maioria dos cromossomos, incluindo os do complemento B (Figuras 4, 5 e 8), sugerindo uma possível função regulatória ou como componentes principais dos centrômeros.

A última etapa envolveu a investigação da composição genômica dos cromossomos B e a presença de sequências específicas da população. Para isso, comparamos os genomas de peixes 1B_e, 3B_{h,e} e 0B através de experimentos de CGH. A alta abundância dos satDNA ou sequências de DNA altamente repetidas compartilhadas entre o complemento A e os cromossomos B podem indicar uma

origem intraespecífica desses cromossomos B (Figura 11). A maioria dos registros de cromossomos B indica uma origem intraespecífica para esses elementos (Camacho et al., 2000; Jones e Houben, 2003; Silva et al., 2014; Houben et al., 2014; Valente et al., 2017; Ruban et al., 2017; Marchioro et al., 2021; dos Santos et al., 2021). Variações na forma dos cromossomos B são comuns em diferentes espécies de Characiformes, como *A. scabripinnis* (Moreira-Filho et al., 2004; Silva et al., 2021), *Moenkhausia* (Ranucci et al., 2021) e *P. lineatus* (Oliveira et al., 1997), mostrando que este cenário não é exclusivo de *Cyphocharax*.

Quanto à origem dos cromossomos B em Curimatidae, existem duas teorias principais. Uma hipótese sugere origens independentes e recentes, enquanto a outra sugere uma origem compartilhada no ancestral da família, seguida de extinção em algumas espécies ou populações (Martins et al., 1996; Sampaio et al., 2016). Variações nos cromossomos B entre espécies exibem instabilidade mitótica e meiótica devido ao comportamento não mendeliano (Sampaio et al., 2011). A incidência de tais cromossomos pode depender da ação combinada de vários fatores, dificultando a compreensão da origem dos cromossomos supranumerários (Camacho et al., 2000). A presença de apenas um satélite B específico e a ocorrência de haplótipos compartilhados observados pela MST (Figura 10) podem indicar uma origem recente para esses cromossomos acessórios, explicando a baixa diferenciação entre as sequências de satDNA observadas entre 0B e 3B.

Os resultados obtidos forneceram uma visão detalhada das variações estruturais e da distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos B, contribuindo para a compreensão da evolução e função desses elementos genéticos.

6 CONCLUSÃO

Ao estudar duas populações alopátricas de *C. modestus*, demonstramos a ocorrência de duas variantes de cromossomos B (B_h e B_e) na população BR. A maior parte do DNA repetitivo presente nessas duas variantes cromossômicas B é compartilhada com os cromossomos A, sugerindo uma origem intraespecífica para eles. Por outro lado, a variante B_e exibe sequências específicas e é altamente divergente da forma B_h .

Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer se esses cromossomos B surgiram independentemente de diferentes cromossomos A ou se

tiveram uma origem única antes da diversificação. Estudos futuros devem focar no comportamento meiótico desses cromossomos e nas sequências centroméricas específicas que podem estar relacionadas às vias de acumulação e manutenção desses elementos acessórios.

7 REFERÊNCIAS

- ARTONI, R. F. et al. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, p. 277-284, 2006.
- BARBOSA, P. et al. Silencing of Transposable Elements Mediated by 5-mC and Compensation of the Heterochromatin Content by Presence of B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis*. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1162, 2021.
- BERTOLLO, L. A. C. et al. Contributions to the cytogenetics of the Neotropical fish fauna. **comparative Cytogenetics**, v. 11, p. 665-690, 2017.
- BLAVET, N. et al. Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 23, p. e2104254118, 2021.
- BRASSESCO, M. S. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and molecular research**, v. 3, p. 293-301, 2004.
- Burt, A. & Trivers, R. L. Genes in Conflict. Belknap Press of Harvard University Press, Boston, MA, 2006.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: **Biological Sciences**, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.
- CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: **The evolution of the genome**. Academic Press, 2005. p. 223-286.

- CARMASSI, A. L. et al. Population biology of *Cyphocarax modestus* (Osteichthyes, Curimatidae) in the Ribeirão Claro stream, Rio Claro (SP). **Biota Neotropica**, v. 8, p. 109-114, 2008.
- CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 8, p. 1907-1932, 2008.
- CHARLESWORTH, B.. Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 11, p. 5618-5622, 1978.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.
- CHUMOVÁ, Z.; MANDÁKOVÁ, T.; TRÁVNÍČEK, P. Are B-chromosomes responsible for the extraordinary genome size variation in selected *Anthoxanthum* annuals?. **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, p. 731-738, 2016.
- CREPALDI, C. et al. Genomic differences between the sexes in a fish species seen through satellite DNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 728670, 2021.
- D'AMBROSIO, U. et al. B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. **New Phytologist**, v. 216, n. 3, p. 635-642, 2017.
- DANIEL, S. N. et al. Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). **Caryologia**, v. 65, n. 3, p. 229-233, 2012.
- DE OLIVEIRA, A. M. et al. Satellite DNAs, heterochromatin, and sex chromosomes of the wattled jacana (Charadriiformes; Jacanidae): A species with highly rearranged karyotype. **Genome**, 2024.
- DEON, Geize Aparecida et al. The role of satellite DNAs in the chromosomal rearrangements and the evolution of the rare XY. **Journal of Heredity**, v. 20, p. 1-11, 2024.

- DHAR, M. K.; KOUR, J.; KAUL, S. Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with special reference to *Plantago lagopus*. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 152, 2019.
- DOS SANTOS, L. P. et al. Chromosomal Instability and Origin of B Chromosomes in the Amazonian Glass Tetra *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864) (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 161, n. 5, p. 249-256, 2021.
- DOUGLAS, R. N.; BIRCHLER, James A. B chromosomes. **Chromosome structure and aberrations**, p. 13-39, 2017.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- FORESTI, F. et al. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.
- GOES, C. A. G. et al. The satellite DNA catalogues of two Serrasalminae (Teleostei, Characiformes): conservation of general satDNA features over 30 million years. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 91, 2022.
- GOTOH, K.. Über die Chromosomenzahl von *Secale cereale*, L. **Shokubutsugaku Zasshi**, v. 38, n. 453, p. en135-en152, 1924.
- GRAVENA, W. et al. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948)(Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). **Brazilian journal of biology**, v. 67, p. 905-908, 2007.
- GREEN, D. M. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, n. 6, p. 818-824, 1990.
- HARTLEY, G.; O'NEILL, R. J. Centromere repeats: hidden gems of the genome. **Genes**, v. 10, n. 3, p. 223, 2019.
- HOUBEN, A. et al. A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 219, p. 127-135, 1999.

- HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.; KLEMME, S. Biology and evolution of B chromosomes. In: **Plant Genome Diversity Volume 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes**. Vienna: Springer Vienna, 2012. p. 149-165.
- HOUBEN, A. et al. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 467-478, 2014.
- HOUBEN, A. B chromosomes—a matter of chromosome drive. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 238635, 2017.
- HOWE, D. K.; DENVER, D. R. Muller's Ratchet and compensatory mutation in *Caenorhabditis briggsae* mitochondrial genome evolution. **BMC evolutionary biology**, v. 8, p. 1-13, 2008.
- JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. **Trends in plant science**, v. 8, n. 9, p. 417-423, 2003.
- JONES, R. Neil; VIEGAS, Wanda; HOUBEN, Andreas. A century of B chromosomes in plants: so what?. **Annals of botany**, v. 101, n. 6, p. 767-775, 2008.
- JONES, R. N. Transmission and drive involving parasitic B chromosomes. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 388, 2018.
- JURKA, J. et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 110, n. 1-4, p. 462-467, 2005.
- KARAFIÁTOVÁ, M. et al. The B chromosome of *Sorghum purpureosericeum* reveals the first pieces of its sequence. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 5, p. 1606-1616, 2021.
- KRETSCHMER, Rafael et al. Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). **Chromosoma**, v. 131, n. 1, p. 29-45, 2022.
- KRETSCHMER, R. et al. Satellitome Analysis in the Southern Lapwing (*Vanellus chilensis*) Genome: Implications for SatDNA Evolution in Charadriiform Birds. **Genes**, v. 15, n. 2, p. 258, 2024.
- KUWADA, Yoshinari. On the number of chromosomes in maize. **Shokubutsugaku Zasshi**, v. 39, n. 465, p. en227-en234, 1925.

- LONGLEY, A. E. Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. **J Agric Res**, v. 35, p. 769-784, 1927.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D. et al. Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). **Heredity**, v. 71, n. 4, p. 352-362, 1993.
- LUI, R. L. et al. Possible common origin of B chromosomes in Neotropical fish (Siluriformes, Auchenipteridae) reinforced by repetitive DNA mapping. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. e21190494, 2021.
- MAKOVA, K. D.; HARDISON, R. C. The effects of chromatin organization on variation in mutation rates in the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 4, p. 213-223, 2015.
- MAKUNIN, Alexey I. et al. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular cytogenetics**, v. 7, p. 1-10, 2014.
- MARCHIORO, P.; CAMPOS, L. A. O.; LOPES, D. M. First record of a B chromosome in *Polybia fastidiosuscula* Saussure (Vespidae) and investigation of chromatin composition through microsatellite mapping. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 11-12, p. 711-718, 2021.
- MARTINS, C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). **Cytobios**, v. 85, p. 247-253, 1996.
- MARTIS, M. M. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.
- MCALLISTER, B. F.; WERREN, J. H. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma**, v. 106, n. 4, p. 243-253, 1997.
- MELO, B. F.; VARI, R. P. New species of *Cyphocharax* (Characiformes: Curimatidae) from the upper rio Negro, Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 327-332, 2014.
- MELO, B. F. et al. Molecular phylogenetics of Neotropical detritivorous fishes of the family Curimatidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 127, p. 800-812, 2018.

- MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. 1, p. 1-9, 2000.
- MILANI, D. et al. Out of patterns, the euchromatic B chromosome of the grasshopper *Abracris flavolineata* is not enriched in high-copy repeats. **Heredity**, v. 127, n. 5, p. 475-483, 2021.
- MONTIEL, E. E. et al. Preferential occupancy of R2 retroelements on the B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91820, 2014.
- MORAES, R. L. R. et al. Tracking the evolutionary trends among small-size fishes of the genus *Pyrrhulina* (Characiforme, Lebiasinidae): New insights from a molecular cytogenetic perspective. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 769984, 2021.
- MORAES, J. N. et al. Karyotype variability in six Amazonian species of the family Curimatidae (Characiformes) revealed by repetitive sequence mapping. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45(2), 2022.
- MORAES, R. L. R. et al. Chromosomal Rearrangements and Satellite DNAs: Extensive Chromosome Reshuffling and the Evolution of Neo-Sex Chromosomes in the Genus *Pyrrhulina* (Teleostei; Characiformes). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13654, 2023.
- MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetraodonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p. 230-234, 2004.
- MULLER, H. J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 1964.
- NASCIMENTO, M. et al. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. **Bioinformatics**, v. 33, n. 1, p. 128-129, 2017.
- NOVÁK, P. et al. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.

- NOVO, C. L. et al. Satellite repeat transcripts modulate heterochromatin condensates and safeguard chromosome stability in mouse embryonic stem cells. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3525, 2022.
- OLIVEIRA, C. et al. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, v. 79, n. 5, p. 473-476, 1997.
- OLIVEIRA, C. et al. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.
- OLIVEIRA, M. R. **Citogenética clássica e molecular de três espécies de curimatídeos, com ênfase no cromossomo B de *Cyphocharax nageii* (Characiformes, Curimatidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), centro de Ciências Biológicas e da saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- OLIVEIRA, M. A. S. **Caracterização genômica de sequências repetitivas em espécies diplóides e poliplóides do gênero *Stylosanthes* Sw.** Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) Universidade Federal de Alagoas – Arapiraca, 2020.
- PANSONATO-ALVES, J. C. et al. Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107169, 2014.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 36, n. 4, p. 307-314, 1983.
- PEREZ, I. L. B. **Biologia reprodutiva de *Cyphocharax modestus* (Characiformes: Curimatidae) no rio Taquari (alto rio Paranapanema), São Paulo, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Zoologia) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.
- PENITENTE, M. et al. Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 1371-1377, 2013.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 126-152, 2012.
- RANDOLPH, L. A. Types of supernumerary chromosomes in maize. **Anat. Rec.**, v. 41, p. 102, 1928.
- RANUCCI, L. et al. Occurrence of euchromatic B chromosomes in natural populations of *Moenkhausia bonita* and *M. forestii* (Pisces: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. e210056, 2021.
- ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.
- RUBAN, A. et al. How next-generation sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. **Genes**, v. 8, n. 11, p. 294, 2017.
- RUIZ-ESTEVEZ, M. et al. B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36600, 2012.
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, p. 487-500, 2017.
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, p. 323-340, 2018.
- SALES-OLIVEIRA, V. et al. Cross-species chromosome painting and repetitive DNA mapping illuminate the karyotype evolution in true crocodiles (Crocodylidae). **Chromosoma**, v. 132, n. 4, p. 289-303, 2023.
- SALES-OLIVEIRA, V. C. et al. Evolution of ancient satellite DNAs in extant alligators and caimans (Crocodylia, Reptilia). **BMC biology**, v. 22, n. 1, p. 47, 2024.

- SAMPAIO, T. R. et al. B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): Mitotic and meiotic behavior. **Comparative cytogenetics**, v. 5, p. 301-313, 2011.
- SAMPAIO, Tatiane R. et al. Molecular Analysis of the B Microchromosome in *Steindachnerina insculpta* (Characiformes: Curimatidae) by Microdissection. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 1, p. 51-57, 2015.
- SAMPAIO, T. R. et al. Evolutionary trends in the family Curimatidae (Characiformes): Inferences from chromosome banding. **Comparative cytogenetics**, v. 10, p.77-95, 2016.
- SANTOS, L. V. D. R. et al. Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 2008.
- SANTOS, L. V. R. et al. Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 265-269, 2008.
- SEMBER, A. et al. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 71, 2018.
- SERRANO-FREITAS, E. A. et al. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, p. 195-207, 2020.
- SILVA, D. M. Z. A. et al. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.
- SILVA, D. M. Z. A. et al. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12726, 2017.
- SILVA, D. M. Z. A. et al. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. **BMC biology**, v. 19, p. 1-17, 2021.
- SILVA, D. M. Z. A. et al. B chromosomes in *Psalidodon scabripinnis* (characiformes, characidae) species complex. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2174, 2022.

STORNIOLI, J. H. F. et al. The B Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) Are Highly Enriched in Satellite DNAs. **Cells**, v. 10, p. 1527, 2021.

STORNIOLI, J. H. F. **Caracterização do satelitoma de *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) e a diferenciação de cromossomos B.** Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e Letras, Assis, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2021.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75:304-306, 1972.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. What makes a centromere?. **Experimental Cell Research**, v.389, n. 2, p. 111895, 2020.

TOMA, G. A. et al. Cytogenetics meets genomics: cytotaxonomy and genomic relationships among color variants of the Asian Arowana *Scleropages formosus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 9005, 2023.

TRIFONOV, V. A. et al. Supernumerary chromosomes, segmental duplications, and evolution. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 1094-1096, 2010.

TRIFONOV, V. A. et al. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC biology**, v. 11, p. 1-11, 2013.

URDAMPILLETA, J. D. et al. Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz.(Paullinieae, Sapindaceae). **Genetica**, v. 136, p. 171-177, 2009.

UTSUNOMIA, Ricardo et al. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150573, 2016.

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

VALENTE, G. T. et al. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, v. 126, p. 73-81, 2017.

- VARI, R. P.; SIDLAUSKAS, B. L.; LE BAIL, P. New species of *Cyphocharax* (Ostariophysi: Characiformes: Curimatidae) from Suriname and French Guiana and a discussion of curimatid diversity on the Guiana Shield. **Cybium**, 2012.
- VENERE, P. C, GALETTI, Jr. P. M. Natural triploidy and chromo-some B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characi-formes). **Braz. J. Genet.**, 7: 681- 687, 1985.
- VENERE, P. C.; GALLETTI, Jr. P. M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Rev. bras. genét**, p. 17-25, 1989.
- VENERE, P. C. et al. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 8, p. 1976-1989, 2008.
- VIDAL, J. A. D. et al. Giant Sex Chromosomes in Omophoita Species (Coleoptera, Chrysomelidae): Structural and Evolutionary Relationships Revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH). **Insects**, v. 14, n. 5, p. 440, 2023.
- WANG, J.; JIA, S. T.; JIA, S. New insights into the regulation of heterochromatin. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 5, p. 284-294, 2016.
- WILSON, Edmund B. Note on the chromosome-groups of *Metapodius* and *Banasa*. **The Biological Bulletin**, v. 12, n. 5, p. 303-313, 1907.
- YANG, F.; GRAPHODATSKY, A. S. Animal probes and ZOO-FISH. **Fluorescence in situ hybridization (FISH)—application guide**, p. 323-346, 2009.
- YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B. Fish-FISH: Molecular cytogenetics in fish species. **Fluorescence in situ hybridization (FISH) application guide**, p. 429-443, 2017.
- YOSHIDA, K. et al. B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PLoS genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002203, 2011.

8 INFORMAÇÕES SUPLEMENTAR

Tabela S1. Principais características dos 116 satDNAs encontrados em *C. modestus*.

S.F	Família de satDNA	A+T (%)	Abundância 3B	Abundância 0B	Abundância 3B/0B	Divergência 0B	Divergência 3 B
	CmoSat01-192	64.1	0.015	0.013	1.18	5.61	5.7
5	CmoSat02-108	52.8	0.014	0.013	1.05	12.75	12.63
	CmoSat03-74	52.7	0.007	0.008	0.89	7.42	7.78
1	CmoSat04-187	64.7	0.007	0.004	1.90	6.89	7.01
	CmoSat05-41	65.9	0.004	0.003	1.42	8.94	8.56
6	CmoSat06-317	57.7	0.002	0.002	1.18	4.7	4.68
	CmoSat07-191	59.2	0.002	0.002	1.16	8.17	8.3
1	CmoSat08-41	61.0	0.002	0.001	3.31	7.52	4.91
5	CmoSat09-772	58.9	0.002	0.002	0.99	8.35	8.31
	CmoSat10-33	72.7	0.002	0.001	2.11	11.19	10.37
7	CmoSat11-64	53.1	0.002	0.002	0.72	6.21	6.41
	CmoSat12-20	60.0	0.001	0.002	0.81	13.72	14.76

4	CmoSat13-2520	62.7	0.001	0.001	0.98	11.51	11.37
6	CmoSat14-158	49.4	0.001	0.001	0.94	16.36	16.4
	CmoSat15-65	64.6	0.001	0.001	1.11	5.22	5.28
	CmoSat16-36	58.3	0.001	0.001	1.00	8.38	8.63
	CmoSat17-42	57.1	0.001	0.001	0.76	13.6	14.02
	CmoSat18-31	51.6	0.001	0.002	0.65	4.29	4.78
	CmoSat19-647	52.9	9.72E-04	1.07E-03	0.91	18.68	18.97
	CmoSat20-50	40.0	9.26E-04	1.05E-03	0.88	7.42	7.57
	CmoSat21-34	58.8	8.99E-04	8.88E-04	1.01	12.52	13.19
	CmoSat22-40	52.5	8.77E-04	1.54E-03	0.57	19.55	19.63
	CmoSat23-1043	41.8	8.34E-04	9.91E-04	0.84	10.39	10.18
	CmoSat24-41	48.8	6.84E-04	7.82E-04	0.87	9.28	9.45
	CmoSat25-41	68.3	6.48E-04	4.97E-04	1.30	24.16	23.43
	CmoSat26-30	46.7	6.29E-04	8.49E-04	0.74	13.93	13.93
	CmoSat27-72	62.5	6.21E-04	4.77E-04	1.30	8.14	7.55

	CmoSat28-43	53.5	5.92E-04	7.08E-04	0.84	4.8	5.29
	CmoSat29-87	56.3	5.80E-04	5.91E-04	0.98	6.26	6.39
	CmoSat30-52	55.8	5.11E-04	4.82E-04	1.06	14.45	14.88
	CmoSat31-66	60.6	5.02E-04	2.96E-04	1.70	10.52	10.36
	CmoSat32-39	53.8	5.00E-04	6.02E-04	0.83	10.06	10.36
8	CmoSat33-23	73.9	3.79E-04	3.31E-04	1.15	13.29	12.86
	CmoSat34-130	50.0	3.79E-04	6.90E-04	0.55	11.23	11.14
7	CmoSat35-36	69.4	3.72E-04	6.04E-04	0.62	7.01	8.55
3	CmoSat36-182	50.5	3.72E-04	1.74E-04	2.14	5.84	5.97
	CmoSat37-43	30.2	3.68E-04	9.22E-04	0.40	8.76	8.69
	CmoSat38-991	62.1	3.67E-04	3.21E-04	1.14	7.9	8.01
	CmoSat39-67	61.2	3.64E-04	3.06E-04	1.19	14.2	13.82
2	CmoSat40-31	54.8	3.59E-04	5.45E-04	0.66	11.43	11.28
	CmoSat41-100	56.0	3.56E-04	4.25E-04	0.84	18.11	18.2
	CmoSat42-21	71.4	3.51E-04	3.14E-04	1.12	9.13	9.42

3	CmoSat43-22	59.1	3.41E-04	1.57E-04	2.18	9.27	9.47
10	CmoSat44-30	56.7	3.38E-04	3.77E-04	0.90	14.8	14.83
10	CmoSat45-44	52.3	3.37E-04	9.43E-05	3.57	9.75	6.05
8	CmoSat46-48	52.1	2.76E-04	2.93E-04	0.94	7.41	7.64
	CmoSat47-947	65.3	2.65E-04	2.43E-04	1.09	2.67	2.47
	CmoSat48-61	54.1	2.63E-04	2.68E-04	0.98	6.17	6.06
	CmoSat49-938	51.5	2.58E-04	1.93E-04	1.33	2.67	2.45
6	CmoSat50-1638	53.1	2.50E-04	1.73E-04	1.44	0.82	1.03
10	CmoSat51-308	53.6	2.45E-04	3.07E-04	0.80	6.58	7.78
	CmoSat52-183	57.4	2.43E-04	4.40E-05	5.53	7.39	4.27
10	CmoSat53-56	53.6	2.30E-04	9.95E-05	2.31	11.07	4.91
	CmoSat54-53	58.5	2.28E-04	3.28E-04	0.70	8.13	8.94
	CmoSat55-49	59.2	2.20E-04	2.80E-04	0.79	8.25	8.32
	CmoSat56-166	51.2	2.08E-04	5.64E-04	0.37	6.47	8.96
10	CmoSat57-245	51.8	1.99E-04	1.60E-04	1.24	6.51	6.46

10	CmoSat58-47	44.7	1.90E-04	5.56E-06	34.14	4.93	3.28
	CmoSat59-853	59.2	1.87E-04	1.55E-04	1.20	14.05	13.75
8	CmoSat60-28	57.1	1.78E-04	2.33E-04	0.77	5.69	6.08
	CmoSat61-38	55.3	1.71E-04	1.48E-04	1.16	8.08	7.49
9	CmoSat62-42	64.3	1.67E-04	2.21E-04	0.76	5.9	6.13
7	CmoSat63-32	65.6	1.66E-04	1.52E-04	1.10	10.39	10.35
4	CmoSat64-664	55.0	1.64E-04	1.44E-04	1.14	4.33	4.31
	CmoSat65-695	51.8	1.63E-04	2.44E-04	0.67	4.03	5.99
	CmoSat66-60	56.7	1.55E-04	1.36E-04	1.15	8.15	7.91
	CmoSat67-140	47.9	1.53E-04	6.80E-05	2.25	3.86	3.7
	CmoSat68-408	57.6	1.47E-04	1.21E-04	1.22	12.46	11.82
10	CmoSat69-213	54.0	1.45E-04	1.18E-04	1.23	5.19	5.35
	CmoSat70-776	54.5	1.45E-04	1.11E-04	1.31	9.76	10.73
10	CmoSat71-68	63.2	1.42E-04	1.23E-04	1.16	12.05	11.31
10	CmoSat72-164	58.5	1.36E-04	1.39E-04	0.98	6.87	6.77

	CmoSat73-36	41.7	1.34E-04	1.71E-04	0.78	7.76	7.62
	CmoSat74-31	54.8	1.33E-04	2.73E-05	4.86	5.82	5.34
	CmoSat75-71	60.6	1.32E-04	1.26E-04	1.04	9.02	8.99
	CmoSat76-16	50.0	1.31E-04	1.93E-04	0.68	7.8	8.25
	CmoSat77-748	56.8	1.30E-04	1.09E-04	1.19	2.58	2.1
	CmoSat78-20	55.0	1.29E-04	3.15E-04	0.41	6.44	7.39
	CmoSat79-843	52.7	1.27E-04	1.12E-04	1.13	1.87	2.4
10	CmoSat80-654	48.5	1.25E-04	1.30E-04	0.97	5.89	5.36
	CmoSat81-240	38.3	1.20E-04	1.36E-04	0.88	9.75	10.25
	CmoSat82-37	56.8	1.16E-04	1.22E-04	0.95	4.42	4.36
	CmoSat83-195	51.8	1.15E-04	1.02E-04	1.12	5.37	5.75
	CmoSat84-22	50.0	1.14E-04	2.21E-04	0.52	6.02	6.03
	CmoSat85-48	50.0	1.13E-04	2.30E-04	0.49	6.82	8.24
	CmoSat86-126	55.6	1.11E-04	9.04E-05	1.23	8.27	8.37
	CmoSat87-1128	56.1	1.09E-04	1.00E-04	1.09	3.41	3.71

	CmoSat88-172	48.8	1.07E-04	8.34E-05	1.28	8.57	7.55
	CmoSat89-1371	53.1	1.04E-04	9.00E-05	1.15	1.74	1.36
	CmoSat90-23	56.5	1.03E-04	1.17E-04	0.88	9.26	10.39
	CmoSat91-20	55.0	9.42E-05	1.73E-04	0.55	14.95	16.64
	CmoSat92-628	53.7	9.39E-05	7.02E-05	1.34	2.78	2.45
	CmoSat93-48	56.3	9.05E-05	1.47E-04	0.62	6.46	6.79
	CmoSat94-39	56.4	9.01E-05	8.28E-05	1.09	6.43	6.65
	CmoSat95-48	47.9	8.84E-05	2.00E-04	0.44	5.74	7.79
	CmoSat96-232	41.8	8.33E-05	9.40E-05	0.89	2.24	2.34
	CmoSat97-126	54.0	8.31E-05	1.40E-04	0.59	7.45	6.82
	CmoSat98-47	40.4	8.31E-05	1.83E-04	0.45	4.73	5.05
	CmoSat99-37	45.9	8.07E-05	1.46E-04	0.55	3.77	4.27
9	CmoSat100-46	58.7	7.84E-05	6.76E-05	1.16	4.82	4.57
	CmoSat101-694	48.3	7.64E-05	7.35E-05	1.04	1.51	1.24
	CmoSat102-25	56.0	7.46E-05	2.50E-04	0.30	10.27	12.61

10	CmoSat103-39	51.3	6.28E-05	1.79E-04	0.35	9.14	12.11
9	CmoSat104-30	53.3	5.79E-05	1.43E-04	0.40	6.68	7.44
	CmoSat105-20	65.0	5.17E-05	1.66E-04	0.31	4.12	5.83
	CmoSat106-582	61.2	5.04E-05	5.93E-05	0.85	1.78	1.94
	CmoSat107-31	41.9	4.82E-05	1.28E-04	0.38	5.35	5.83
	CmoSat108-30	56.7	4.42E-05	1.11E-04	0.40	10.68	12.83
	CmoSat109-228	52.2	4.42E-05	9.03E-05	0.49	9.06	9.16
	CmoSat110-434	52.3	4.19E-05	3.96E-05	1.06	0.81	0.77
	CmoSat111-18	44.4	3.58E-05	3.11E-04	0.11	8	9.15
	CmoSat112-23	52.2	3.35E-05	1.04E-04	0.32	7.47	8.54
	CmoSat113-350	38.6	3.06E-05	9.74E-05	0.31	9.12	12.98
	CmoSat114-860	52.7	2.96E-05	8.79E-05	0.34	1.95	2.4
	CmoSat115-319	52.7	2.78E-05	2.78E-05	1.00	2.45	2.94
	CmoSat116-755	57.6	2.49E-05	1.60E-04	0.16	1.72	8.51

Fonte: Elaborado pelo Autor.

S.F: superfamília.

Tabela S2. *Primers* de CmoSatDNAs desenhados no presente estudo.

Família de satDNA	Primer F	Primer R
CmoSat01-192	GTTTTTGCAGGTTCCAGTTGTT	TGCCTGTAGTTCAACCCCAA
CmoSat02-108	GGCGTCCTAGGGCATTACAA	CTGTTTCCCACGCTCTTAGA
CmoSat03-74	CCACATAGCGCTACATAACAC	CAGTGCTATATACTCCACCTG
CmoSat04-187	CCAAATATGTAAGAGCCATCC	GAACTCATCTCAAGCTTTTCAG
CmoSat05-41*	CATTAAGTGAACAATCGTGC	AGAACAATCGTGCTAACTCTGC
CmoSat06-319	GCTTGTCTCTGTTGAAGGGC	TCAGTGTCTCTCCTTGGCTT
CmoSat07-191	GACCTAGGGTTAATGTTACAG	TAACCATAACCCTAGCTGTAAC
CmoSat08-41**	AGTATAGAACAGTACAGACT	CTCTCCTGAGGTAGTTATTA
CmoSat09-772	TTCCTGTTGGGCGGAGCTAA	GGTGGGAATGTAAAAGTCGTC
CmoSat11-64	ACTGTAATGTGCCACCAGGT	CATGCTATGTGACAGTGCTG
CmoSat31-66	CGCATTGTACACTTTCCCACT	CCCTCTAGTGGACTTTATTTGA
CmoSat36-182	GTCTACTACTTGTCTTCTACCA	CCTCCTTTAGAGCGGTGTG
CmoSat37-43	TCAGAGCGCAGCAGTGTTTCGC	GCCGAGGACGAGCGAGGGA
CmoSat45-44*	GACACTGTACAGAACCGTTAC	TGGTAGAGAGGTGAAGGAAC
CmoSat52-183	TATTTTCATGGGCCTGCTGACC	TGTGGTTAAGCTGTGCCTATTA
CmoSat53-56	AGAGTCTTATAGCAGCAGGA	ATAACCAGTCTCCATACTG
CmoSat56-166	TTAGAGCTACGAATAGGTCTG	CCCTAACCCTAGCTCCAG
CmoSat58-47	GTGGGTGATGTACAGGTC	CACTGATCTACAGCCAGAGT
CmoSat67-140	GAGGTGAAGTGCGAGGGTCT	CACCACCACCTCCCTTAGT

Fonte: Elaborado pelo Autor.

*Não amplificado na PCR.