

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Identificação e mapeamento de famílias de DNA repetitivo em
Characidium sp. aff. *C. vidali* (Teleostei, Characiformes) e sua atuação na
evolução dos cromossomos B

Maria Lígia Marques de Oliveira Nobile

Botucatu/SP

Fevereiro de 2019

Maria Lígia Marques de Oliveira Nobile

**Identificação e mapeamento de famílias de DNA repetitivo em
Characidium sp. aff. *C. vidali* (Teleostei, Characiformes) e sua atuação
na evolução dos cromossomos B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu/SP

Fevereiro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Nobile, Maria Lígia Marques de Oliveira.

Identificação e mapeamento de famílias de DNA repetitivo em *Characidium sp. aff. C. vidali* (Teleostei, Characiformes) e sua atuação na evolução dos cromossomos B / Maria Lígia Marques de Oliveira Nobile. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Érica Alves Serrano Freitas

Coorientador: Mauro Nirchio Tursellino

Capes: 20400004

1. Peixe - Genética. 2. Teleosteos. 3. Characiformes. 4. DNA - Análise. 5. Cromossomos.

Palavras-chave: *Characidium*; DNA repetitivo; NGS; cromossomo B.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que sempre guiou e iluminou meus caminhos, que sempre me encheu de coragem e esperança, mesmo nos momentos de dúvidas.

Aos meus pais, um agradecimento mais que especial! Obrigada pelo suporte, pelo carinho, por tanto zelo, por sempre caminharem ao meu lado, e por terem me proporcionado uma vida tão linda! Sou muito grata à Deus pela nossa família...Eu não teria chegado até aqui sem vocês! OBRIGADA! Amo vocês!

Ao meu marido André, meu parceiro e melhor amigo, que me acompanhou em toda essa trajetória. Sempre com muito amor, carinho e paciência (as vezes rs!). Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho. Obrigada por tornar minha jornada mais leve. Te amo muito, muito mesmo!

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti, de quem lembrarei sempre com muito carinho por toda a minha trajetória. Mestre atencioso, dedicado e paciente, obrigada por nos permitir sonhar, e REALIZAR!

Ao professor Claudio, pelo exemplo de pesquisador, também sempre pronto para ajudar e aconselhar.

Ao nosso querido técnico Renato Devidé, pela disponibilidade em nos ajudar sempre, pelas coletas, pelas metáfases e Banda C perfeitas (rs!), pelas brincadeiras, piadas, cafés, conselhos, enfim, você torna nosso ambiente de trabalho mais leve e agradável.

A Fabilene, Bruno Melo e Duflío, por toda ajuda, dedicação, conselhos e correções do conteúdo deste trabalho. Temos sorte em nosso laboratório, pois podemos sempre contar com grandes profissionais. Desejo de coração muita luz e sucesso no caminho de vocês. Obrigada!

Aos profissionais que pude conhecer: Nadayka, Cristian, Camila Souza, Gabriel (Pink), Fábio Roxo, Cristiane.

As amigas, parceiras e cúmplices: Fabilene, Luz e Najila. Acredito que Deus coloque anjos em nossas vidas, e no meu caso ele foi bastante generoso e diverso, me deu uma baiana, uma colombiana e uma rondoniana...que sorte a minha!

A uma turma muito especial, que embora ainda jovens (de idade), já mostraram muita maturidade e comprometimento: Gabriela Omura, Beatriz Boza, Letícia, Lucas Peres, May, Giovana, Bruno. Obrigada por toda ajuda!

Aos colegas de Laboratório, alguns que já não convivem diariamente, mas que de alguma forma fizeram a diferença em meus dias, seja com uma ajuda para a realização de técnicas, tirando uma dúvida conceitual, ou mesmo com uma pausa para um cafelzinho (momento revigorante do dia).

Aos colegas Ricardo Utsunomia pelo delineamento inicial do projeto e Érica Alves Serrano Freitas pelas colaborações no desenvolvimento inicial do trabalho.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Morfologia, que me abriram as portas desde 2009, e me proporcionaram a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), à todos que compõem essa equipe, por toda disponibilidade e atenção dedicada a cada um de nós discentes.

A CAPES, por ter me concedido a bolsa durante estes 4 anos.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	1
2. Objetivos Gerais	6
3. Resultados e Discussões	7
3.1 Capítulo1: Investigações citomoleculares no genoma de <i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i> (Characiformes, Crenuchidae)	8
3.2 Capítulo 2: Ferramentas citomoleculares e filogenéticas indicam origem interespecífica de cromossomos B de <i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	22
3.3 Capítulo 3: Sequenciamento massivo e busca de DNAs satélites em cromossomos B de <i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	44
4.Considerações finais	54
5. Referências	56

RESUMO

Characidium é um grupo de peixes amplamente distribuídos pela região Neotropical, embora seja considerado o mais especioso dentro de Crenuchidae, do ponto de vista citogenético o número de espécies investigadas ainda é baixo, o que dificulta a caracterização quanto a organização cromossômica do gênero. Em relação ao número diploide, as espécies de *Characidium* conservaram um cariótipo com $2n = 50$ cromossomos, do tipo metacêntricos e submetacêntricos (com exceções), o que resulta em uma macroestrutura homogênea para o grupo. Porém, investigações utilizando sequências repetitivas têm contribuído para ilustrar que a organização microestrutural cromossômica pode diferir entre as espécies, refletindo o hábito destes peixes constituírem populações pequenas e isoladas em cabeceiras de riachos. Adicionalmente, algumas espécies de *Characidium* também foram descritas portando cromossomos B em seus cariótipos, e a utilização de ferramentas citomoleculares têm contribuído para explorar quanto a origem e evolução destes componentes cariotípicos. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi agregar técnicas citomoleculares com resultados de sequenciamento massivo, para tentar compreender a ocorrência de cromossomos B no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Os resultados obtidos mostraram que i) o mapeamento físico de diferentes sondas de DNA repetitivo contribuíram não apenas para caracterizar o cariótipo da espécie em estudo, como também adicionaram mais informações quanto a organização e evolução da microestrutura cromossômica dos peixes pertencente à *Characidium*; ii) *Characidium* sp. aff. *C. vidali* mostrou sítios teloméricos intersticiais (ITS e double-ITS), e como a espécie apresenta o número diploide padrão do grupo ($2n = 50$ cromossomos), não há indícios de rearranjos cromossômicos estruturais, e tais marcações podem ser evidências de mecanismos de reparo do próprio genoma, evitando possíveis quebras e modificações na estrutura cromossômica da espécie; iii) a sonda telomérica também marcou a porção terminal dos cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e como todas as células de todos os espécimes analisados apresentaram supranumerários, foi proposto que nessa população, os cromossomos B já estão bem estabelecidos; iv) os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* tiveram origem intraespecífica, e os resultados obtidos após pintura cromossômica com a sonda CvBp revelam que ao longo de sua evolução, estes supranumerários acumularam sequências que não são mais compartilhadas com os cromossomos do complemento A da própria espécie; v) os dados obtidos com as marcações de quatro microssatélites e pintura cromossômica (com a sonda CvBp), evidenciaram uma relação entre os cromossomos B

Characidium sp. aff. *C. vidali* e um par de cromossomos acrocêntricos presentes em *C. serrano*, *C. pterostictum* e *C. timbuiense*, e somado a isso o padrão de marcação dos sítios teloméricos, assim como análises de filogenia e distância genética mostram que essas espécies representam um grupo monofilético; vi) tais evidências permitiram propor que os supranumerários presentes em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* apresentam relação com um genoma ancestral ao grupo monofilético; vii) o mapeamento de sequências satélites obtidas por sequenciamento massivo, não apresentou marcações nos cromossomos B da espécie em estudo. Dessa maneira, o presente trabalho reforça a proposição de que *Characidium* é um interessante modelo para estudos citogenéticos, com ênfase sobre origem e evolução de cromossomos supranumerários.

Palavras-chave: *Characidium*, DNA repetitivo, cromossomo B, Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

ABSTRACT

Characidium is a group of fish widely distributed in the Neotropical region, although it is considered the most speciose within Crenuchidae, from the cytogenetic point of view the number of species investigated is still low, which makes it difficult to characterize the chromosomal organization of the genus. In relation to the diploid number, *Characidium* species retained a karyotype with $2n = 50$ chromosomes, metacentric and submetacentric (with exceptions), resulting in a homogeneous macrostructure for the group. However, investigations using repetitive sequences have contributed to illustrate that the chromosomal microstructural organization may differ between species, reflecting the habit of these fish constituting small and isolated populations in headwaters of streams. In addition, some species of *Characidium* have also been described carrying B chromosomes in their karyotypes, and the use of cyto-molecular tools has contributed to explore the origin and evolution of these karyotype components. In this sense, the objective of the present study was to aggregate cyto-molecular techniques with massive sequencing results to try to understand the occurrence of B chromosomes in the genome of *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. The results showed that i) the physical mapping of different repetitive DNA probes contributed not only to characterize the karyotype of the species under study, but also added more information about the organization and evolution of the chromosomal microstructure of fish belonging to *Characidium*; ii) *Characidium* sp. aff. *C. vidali* showed interstitial telomeric sites (ITS and double-ITS), and since the species shows the standard diploid number of the group ($2n = 50$ chromosomes), there are no indications of structural chromosome rearrangements, and such markings may be evidence of mechanisms of repair of the genome itself, avoiding possible breaks and modifications in the chromosome structure of the species; iii) the telomeric probe also marked the terminal portion of the B chromosomes of *Characidium*

sp. aff. *C. vidali*, and as all the cells of all the analyzed specimens presented supernumerary, it was proposed that in this population, the B chromosomes are already well established; iv) the B chromosomes of *Characidium* sp. aff. *C. vidali* were originated intraspecific, and the results obtained after chromosome painting with the CvBp probe reveal that throughout their evolution, these supernumerary accumulated sequences that are no longer shared with the complement chromosomes of the species itself; v) the data obtained with the four microsatellite and chromosome painting (with the CvBp probe), showed a relationship between the B chromosomes *Characidium* sp. aff. *C. vidali* and a pair of acrocentric chromosomes present in *C. serrano*, *C. pterostictum* and *C. timbuiense*, and in addition to the marking pattern of telomeric sites, as well as analyzes of phylogeny and genetic distance show that these species represent a group monophyletic; vi) such evidence allowed us to propose that the supernumeraries present in *Characidium* sp. aff. *C. vidali* present relationship with an ancestral genome to the monophyletic group; (vii) the mapping of satellite sequences obtained by massive sequencing did not show B chromosomes of the species under study. In this way, the present work reinforces the proposition that *Characidium* is an interesting model for cytogenetic studies, with emphasis on origin and evolution of supernumerary chromosomes.

Keywords: *Characidium*, repetitive DNA, B chromosome, Next Generation Sequencing (NGS).

1. Introdução geral

Characidium é considerado o gênero mais especioso dentro da família Crenuchidae, e até o momento possui cerca de 65 espécies descritas (Buckup & Van der Sleen 2017). As espécies deste grupo apresentam ampla distribuição pela região Neotropical, com exemplares ocorrendo desde o Panamá, como *Characidium marshi*, até a Argentina, como *Characidium rachovii* (Buckup 2003). Estes peixes são habitualmente restritos a pequenos tributários (Caramschi 1986), e comumente tendem a formar populações pequenas, e isoladas em cabeceiras de riachos (Maistro et al. 1998). Na maioria, tais ambientes são de altitude elevada e fluxo de água intenso, o que pode favorecer a ocorrência de endemismo e especiações alopátricas nas populações (Buckup 2003, 2011). Todas essas características influenciam diretamente na evolução da estrutura cariotípica das espécies dentro do gênero *Characidium*, principalmente quanto a composição da microestrutura cromossômica destes peixes.

Do ponto de vista citogenético, o gênero *Characidium* se tornou um grupo bastante interessante a ser estudado, embora apresente cariótipo conservado com $2n = 50$ cromossomos (na maioria das vezes metacêntricos e submetacêntricos), há relatos de variações em relação à microestrutura cariotípica das espécies. Dentre essas diferenças, já foram reportadas desde variações em relação a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Maistro et al. 1998; Vicari et al. 2008; Pucci et al. 2014), triploidia natural (Centofante et al. 2001; Pansonato-Alves et al. 2011b), ocorrência de cromossomos ligados ao sexo (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a; Machado et al. 2011; Pazian et al. 2013; Pucci et al. 2014; Scacchetti et al. 2015a), presença de cromossomos B (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2014; Scacchetti et al. 2015a, Serrano et al. 2017, 2019), e até mesmo variação quanto a distribuição de sequências repetitivas (Vicari et al. 2008; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015a, Pucci et al. 2018). Todas essas características evidenciam que a organização da microestrutura dos cariótipos é mais variável entre as populações, e essas informações também agregam importância para investigações sobre a evolução cromossômica do grupo.

Muitos trabalhos têm mostrado resultados satisfatórios quanto ao uso de DNA repetitivo como sondas, com o objetivo de investigar mudanças na estrutura cariotípica dos organismos ao longo da sua história evolutiva. Além disso, tais sequências podem ser consideradas excelentes marcadores citogenéticos, por terem proporcionado resultados consistentes sobre a diversificação de cromossomos B, de cromossomos ligados ao sexo,

e até mesmo homeologia cromossômica entre espécies próximas (Griffiths et al. 2008; Vicari et al. 2010; Blanco et al. 2014). Grande parte do genoma dos eucariotos é composto por sequências repetitivas, e o acúmulo dessas regiões pode estar relacionado com as diferentes quantidades de DNA apresentadas pelos organismos (Doolittle & Sapienza 1980; Cavalier-Smith 1985; Kidwell 2002; Gregory et al 2007). Além disso, já se sabe que essas sequências repetitivas variam em número de cópias, sequências de nucleotídeos e distribuição nos genomas (Wagner et al 1993; Charlesworth et al 1994), podendo se organizar em tandem como as famílias multigênicas (Sumner 2003; Nagoda et al. 2005), os minissatélites, microsatélites e sequências satélites (Maxon et al 1983; Hadjiov 1985; Charlesworth et al 1994), ou podem estar dispersas pelo genoma como os transposons e retrotransposons (Charlesworth et al 1994),

São chamadas famílias multigênicas quando um conjunto de genes apresentam estrutura e função similar, e se originaram a partir de um gene ancestral comum (Nei & Rooney 2005). No genoma dos eucariontes superiores, os genes ribossomais estão organizados em duas famílias multigênicas, que se repetem centenas, ou até milhares de cópias (Martins et al 1999). Em *Characidium*, os sítios de rDNA 18S são considerados mais conservados do que os sítios de rDNA 5S, evidenciando a evolução cariotípica independente das populações deste gênero.

Os genes histonas também constituem uma família multigênica, composta pelas sequências de H2A, H2B, H3 e H4, variando em número de cópias, e podendo ou não se espalhar pelo genoma (Kedes 1979; Childs et al. 1981). Em peixes, o mapeamento físico dessas sequências também revela informações sobre a estrutura e organização cariotípica das espécies, como é o caso de *Symbranchus* e *Orestias* onde esses genes histonas H3 e H4 estão espalhados pelo genoma (Utsunomia et al. 2014; Araya et al. 2017), enquanto em *Characidium* estes dois genes estão clusterizados no mesmo par cromossômico (Serrano et al. 2017; Pucci et al 2018).

As sequências teloméricas são repetições de (TTAGGG)_n que no genoma dos vertebrados já são consideradas conservadas (Meyne et al. 1990). Essas sequências geralmente marcam as porções terminais dos cromossomos (Meyne et al. 1990; Chew et al. 2002), porém, a hibridação *in situ* já revelou sítios teloméricos intersticiais (ITS) em algumas espécies de peixes, podendo indicar ocorrência de eventos como fusões, fissões e/ou inversões, e estes eventos muitas vezes alteram a macro ou microestrutura cromossômica dos indivíduos (Abuín et al. 1996; Chew et al. 2002; Blanco et al. 2013; Porto et al. 2014). Descobertas sobre sítios ITS (sítios teloméricos intersticiais) em

peixes, já contribuíram para auxiliar nas investigações sobre origem de cromossomos ligados ao sexo (Cioffi & Bertollo 2010; Utsunomia et al. 2014), eventos de fusão (Albuín et al 1996; Chew et al 2002), além de terem sido mapeados em associação com outras sequências como DNA satélites (Garrido-Ramos et al. 1998, Scacchetti et al. 2014), e região organizadora de nucléolo (Albuín et al. 1996).

Scacchetti et al. (2014) mapearam sequências teloméricas em sete populações de *Characidium*, e observaram que além das marcações teloméricas presentes em todos os cromossomos de todos os indivíduos analisados, um grupo de espécies, filogeneticamente reconhecido como monofilético, apresentaram sítios teloméricos intersticiais (ITS) e alguns ainda sítios de double-ITS. Porém, como *Characidium* é conhecido por apresentar um cariótipo homogêneo, as marcações não teloméricas seriam consequências de associações entre sequências teloméricas com DNA satélites, seguido de dispersão por elementos móveis e/ou recombinação ectópica, e estes eventos teriam ocorrido de maneira particular na evolução cariotípica de cada população, influenciando diretamente na estruturação cromossômica do grupo.

Quanto as sequências repetitivas organizadas em tandem no genoma dos eucariontes, a classificação depende do tamanho dos fragmentos repetidos, sendo os minissatélites constituídos de 15 a 100pb (Levinson & Gutman 1987). Os microsatélites são representados por repetições de 1 a 6 nucleotídeos, localizados preferencialmente nas porções não codificantes dos genomas (Tautz & Renz 1984; Litt & Luty 1989; Weber; May 1989; Toth; Gáspari; Jurka 2000), e se distribuem de forma não randômica nos cromossomos (Cuadrado & Jouve 2007; Ruiz-Ruano et al 2014). Em peixes, o mapeamento físico de sequências de microsatélites têm contribuído consideravelmente com investigações sobre a estrutura cariotípica de populações, já que os motivos podem seguir um padrão evolutivo próximo, ou distinto entre os grupos (Scacchetti et al. 2015a; Schneider et al. 2015; Piscor et al. 2016; Utsunomia et al. 2018). Motivos de microsatélites já foram mapeados co-localizados com genes ribossômicos, e de acordo com os autores, isso pode ser de alguma forma vantajoso para a evolução cariotípica das populações (Merlo et al. 2007, Scacchetti et al. 2015a; Piscor et al. 2016; Utsunomia et al. 2018). Em *Characidium* o mapeamento físico dos microsatélites tem contribuído com informações em estudos sobre cromossomos B e cromossomos ligados ao sexo, pois são considerados excelentes marcadores dos mesmos (Scacchetti et al. 2015a; Piscor et al. 2016).

Como já reportado anteriormente, os DNAs satélites também constituem uma fração de sequências repetidas em tandem, descritos pela primeira vez em peixes no fim dos anos 80 (Datta et al. 1988; Moyer et al. 1988; Monaco et al. 1989). Essas sequências não são codificadoras, e tendem a se acumular preferencialmente em regiões heterocromáticas, embora já tenham sido observadas em porções eucromáticas (López-Flores & Garrido-Ramos 2012; Garrido-Ramos 2015; Ruiz-Ruano et al. 2016). Essas repetições se organizam em famílias pelo genoma, que geralmente são específicas dentro de um gênero ou espécies (Vicari et al., 2010; Garrido-Ramos, 2015). Muitos trabalhos têm mostrado que os DNA satélites podem também ser considerados excelentes marcadores de cromossomos sexuais e cromossomos B em peixes (Nakayama et al. 1994; Nanda et al. 1990; Devlin et al. 1991; Mestriner et al. 2000; Jesus et al. 2003; Vicari et al. 2010; Utsunomia et al. 2016), e com isso os autores buscam compreender melhor sobre a origem e evolução destes cromossomos nos cariótipos das espécies.

Os cromossomos B (ou supranumerários) são considerados elementos genômicos adicionais ao complemento padrão A, que apresentam um caminho evolutivo próprio (Camacho et al. 2000). Estes cromossomos não seguem as leis de herança mendeliana, não se recombinam com cromossomos do complemento A, e são considerados parasitas no genoma portador (Camacho et al. 2000). Já foram encontrados em fungos, plantas e animais (Navas-Castillo et al. 1985; Alfenito & Birchler 1993; Covert 1998), e estudos buscam cada vez mais compreender como se originaram e evoluíram, e se compartilham sequências com os cromossomos do complemento padrão do cariótipo portador (Camacho et al. 2000; Bugrov et al. 2007).

Assim, alguns estudos já conseguiram mostrar que cromossomos B podem alocar elementos repetitivos em sua composição, como genes ribossomais, histonas, elementos transponíveis, microssatélites e até mesmo genes de cópia única (Camacho 2005; Bugrov et al. 2007; Teruel et al. 2010; Leach et al. 2005; Ruíz-Estévez et al. 2012; Trifonov et al. 2013; Silva et al. 2014; Valente et al. 2014). Além disso, também foram evidenciados cromossomos B portadores de genes ativos em fungos, onde os supranumerários apresentaram genes que conferiam resistência à antibióticos (Miao et al 1991), em canídeos, em que esses cromossomos B foram relacionados a proto-oncogenes e genes supressores tumorais (Graphodatsky 2005; Makunin 2014); gafanhotos com histonas H3 e H4 (Teruel & Cabrero 2010); e os supranumerários de ciclídeos (Yoshida 2011) e cervídeos (Trifonov 2013; Makunin 2016) apresentaram genes codificantes de proteínas.

Com o passar dos anos, diferentes tecnologias foram surgindo e de certa forma agregando informações às investigações para melhor compreender sobre cromossomos B. Através da Híbridação *in situ* Fluorescente, Mestriner et al. (2000) mapeando sequências de DNA satélite em *Astyanax scabripinnis*, propuseram que o macrocromossomo B presente na espécie teria se originado como um isocromossomo. López-León et al. (1993) utilizando a mesma técnica conseguiram identificar que os supranumerários de *Eyprepocnemis plorans* tiveram origem intraespecífica. Já com a pintura cromossômica, trabalhos conseguiram hibridar sondas produzidas a partir de cromossomos B microdissecados de diferentes genomas, o que também trouxe novas informações sobre origem ou padrão de homologia entre os supranumerários e os cromossomos do complemento A das espécies (Trifonov et al. 2002; Teruel et al. 2009; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2014; Utsunomia et al. 2016; Serrano et al. 2017). Por fim, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) permitiu aos estudos investigar a composição destes cromossomos, caracterizando desde sequências repetitivas, até genes de cópia única localizados nos supranumerários das espécies (Trifonov et al. 2013; Houben et al. 2014; Makunin et al. 2014; Valente et al. 2014).

Em *Characidium*, o número de espécies descritas como portadoras de cromossomos B ainda é pequeno (Miyazawa & Galetti Jr. 1994; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015b; Serrano et al. 2017), e apenas alguns estudos reportaram possibilidades para o surgimento destes supranumerários. Para Pansonato-Alves et al. (2014), tanto em *Characidium pterostictum* quanto em *C. gomesi*, há uma relação dos cromossomos B com os cromossomos sexuais, reportando uma possível origem intraespecífica dos supranumerários, assim como proposto em Serrano et al. (2017), porém neste segundo caso, a sonda dos cromossomos B de *Characidium alipioi* apresentaram homologia com o par cromossômico 19 da espécie. Até o momento, *C. oiticiai* é a única espécie do gênero com origem interespecífica dos cromossomos B (Pansonato-Alves et al. 2014). Se por um lado já se tem conhecimento que em *Characidium* os cromossomos sexuais tiveram uma origem comum (Vicari et al. 2010; Machado et al. 2011, Pazian et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014; Scacchetti et al. 2015a), os cromossomos B parecem apresentar uma origem independente dentro do gênero (Pansonato-Alves et al. 2014), e pode ser um reflexo da estruturação cariotípica particular das populações durante a evolução da sua microestrutura cariotípica.

2. Objetivo

O presente trabalho foi desenvolvido dentro do programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IB/UNESP/Botucatu) visando aumentar o conhecimento sobre a estrutura molecular de cromossomos supranumerários e os possíveis mecanismos de origem e evolução destes elementos genômicos.

Este objetivo foi alcançado cumprindo-se os seguintes passos:

- a) compreender a estrutura cariotípica de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*;
- b) investigar a frequência de ocorrência dos cromossomos B na espécie *Characidium* sp. aff. *C. vidali*;
- c) investigar se os cromossomos B desta espécie compartilham sequências com os cromossomos do complemento A;
- d) investigar se os cromossomos B desta espécie compartilham sequências com os o cariótipo de outras espécies de *Characidium*;
- e) sequenciar e caracterizar elementos repetitivos no genoma dessa espécie, notadamente aqueles alocados nos cromossomos supranumerários;
- f) investigar se os cromossomos B presentes na espécie em estudo tiveram origem interespecífica ou intraespecífica.

3. Resultados e Discussões

Os Resultados e Discussões do presente trabalho estão organizados em três capítulos apresentados a seguir. As referências do presente estudo estão organizadas na parte final do trabalho.

3.1 Capítulo 1

Investigações citomoleculares no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Characiformes, Crenuchidae)

3.2 Capítulo 2

Ferramentas citomoleculares e filogenéticas indicam origem interespecífica de cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*

3.3 Capítulo 3

Sequenciamento massivo e busca de DNAs satélites em cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*

3.1 Capítulo 1

Investigações citomoleculares no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Characiformes, Crenuchidae)

Introdução

Characidium é considerado o gênero mais especioso dentro da família Crenuchidae, com aproximadamente 65 espécies descritas (Buckup e Van der Sleen 2017). Estes peixes estão amplamente distribuídos pela região Neotropical, desde o leste do Panamá até o nordeste da Argentina (Buckup 2003), e devido às suas características ecológicas, é comum se restringirem a pequenos tributários (Carasmaschi 1986). Geralmente formam populações pequenas e isoladas em cabeceiras de riachos (Maistro et al. 1998), e como estes ambientes geralmente apresentam altitudes elevadas e fluxo intenso de água, e as chances destes peixes apresentarem especiação alopátrica ou elevado grau de endemismo são grandes (Buckup 2003, 2011). Tais fatores podem ter impacto direto na evolução da estruturação cariotípica das populações de *Characidium*, principalmente no que diz respeito à composição da microestrutura dos cromossomos.

Do ponto de vista citogenético, *Characidium* é um grupo estável, com o número diploide de $2n = 50$ cromossomos (meta e submetacêntricos), comum a maioria das espécies. Embora, alguns trabalhos tenham identificado variações na estrutura cariotípica de algumas populações como a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2014), presença de cromossomos supranumerários (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, 2011b, 2014; Serrano et al. 2017), distribuição de sequências de DNA repetitivo (Vicari et al. 2008; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011a, 2014; Scacchetti et al. 2014, 2015a; Serrano et al. 2017; Pucci et al. 2018) e ocorrência de triploidia natural (Centofante et al. 2001; Pansonato-Alves et al. 2011b). Essas diferenças cariotípicas observadas entre as populações fazem de *Characidium* um interessante grupo para estudos citogenéticos, pois rearranjos na microestrutura dos cromossomos podem estar ocorrendo e se fixando nas populações devido as suas características biológicas.

Como já se sabe, o genoma dos eucariontes é composto por grande quantidade de sequências repetitivas, e o mapeamento físico assim como o conhecimento da organização molecular dessas porções tem contribuído para estudos que busquem

entender melhor as diferenças estruturais que ocorrem nos cariótipos de muitas espécies de peixes (López-Flores e Garrido-Ramos 2012; Cioffi e Bertollo 2012). O acúmulo destes elementos repetitivos em regiões específicas do genoma, podem levar à quebras, inversões, deleções e ampliações nos cromossomos (Lim e Simmons 1994; Dimitri et al. 1997; Raskina et al. 2008), e isso pode refletir diretamente na macro e/ou microestruturação cariotípica de uma espécie ou população.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os padrões de distribuição de sequências teloméricas, histonas e microssatélites no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, visando compreender a relação dessas porções repetitivas com a estruturação cariotípica da população, e a partir disso agregar informações para a construção de um mapa citogenético que ilustre a história evolutiva dos cariótipos dos peixes do gênero *Characidium*.

Materiais e Métodos

Os procedimentos para coleta, manutenção e análise dos peixes foram efetuados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Protocolo nº 971 – CEUA – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Amostragem e experimentos de citogenética clássica

Foram analisados 23 espécimes de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (10 fêmeas e 13 machos) provenientes do Córrego Bananeiras, bacia do Rio São João, município de Silva Jardim - RJ (S 22°28'51,8" W 42°23'39"). O local de coleta está amostrado na Figura 1 (a, b, c, d). Todos os exemplares foram identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, São Paulo, Brasil. A Figura 2 ilustra um exemplar da espécie em estudo.



Figura 1: Amostragem do ponto de coleta dos espécimes de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* utilizados no presente trabalho (a, b, c, d).



Figura 2: Exemplar de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* utilizado no presente estudo.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões celulares, com a retirada do rim anterior dos animais, seguindo Foresti et al. (1981). A classificação dos cromossomos e o bandamento C foram de acordo com Levan (1964) e Sumner (1972), respectivamente.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado de 16 exemplares de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante.

Preparação das sondas

As três sondas utilizadas no presente estudo foram obtidas pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a partir do DNA genômico de um exemplar de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Para a obtenção das sondas de histonas H3 e H4 foram utilizados os primers H3F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3R (5'-ATATCCTTRGGC ATRATRGTGAC-3') (Colgan et al. 1998) e H4F-2S (5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3') e H4F-2er (5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3') (Pineau et al. 2005), respectivamente. Para a amplificação da sonda telomérica foram utilizados os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991).

A marcação das sondas foi realizada por PCR, sendo H3 e telomérica marcadas com Biotin-16-dUTP (Roche), enquanto H4 foi marcada com Digoxigenin-11-dUTP (Roche). Já as sondas de oligonucleotídeos contendo as sequências dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ foram marcadas diretamente com TAMRA pela Sigma, como descrito por Kubat et al. (2008).

Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

O mapeamento físico das sondas foi realizado em lâminas de machos e fêmeas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, seguindo o proposto por Pinkel et al. (1986). Primeiramente, as lâminas foram incubadas em RNase (50ug/ml) à 37°C durante 1 hora, e o tempo de denaturação do DNA em formamida 70%/2xSSC foi de 5 minutos à 70°C. O mix de hibridação foi montado com formamida 50%, 2xSSC, sulfato dextrano 10% e sonda (s), com tempo de denaturação de 10 minutos à 95°C. Foram adicionados 30ul deste mix por lâmina, que foram incubadas *overnight* à 37°C. As lavagens de pós hibridação foram de acordo com as sondas usadas: (i) o double-FISH com sondas de H3/H4 e o FISH com a sonda telomérica foram lavadas em 0,4xSSC/0,3% Triton por 5 minutos à 73°C, em seguida com 2xSSC/0,1% Triton por 30 segundos à RT, bloqueadas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos à RT e novamente lavadas com Triton 0,5%/4xSSC. As detecções destas sondas foram feitas com avidin-FITC (histona H3 e

Telomérica) e anti-digoxigenin-rhodamina (histona H4); (ii) as lâminas marcadas com oligonucleotídeos foram lavadas com 2xSSC por 5min à RT, e depois em PBS 1x por 1min também à RT. Todas as lâminas foram coradas com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif, USA), analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens, obtidas a partir do software mage Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Md. USA).

Resultados

Estruturação cariotípica e Bandamento C

Todos os exemplares de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* analisados no presente estudo mostraram número diploide de $2n = 50$ cromossomos, divididos em $32m + 18sm$ (Figura 3). A espécie apresentou também cromossomos B, que embora mitoticamente instáveis (variação de 1 a 4 por célula), estiveram presentes em todas as células de todos os indivíduos analisados. Estes supranumerários foram classificados morfológicamente como micro acrocêntricos, e nenhuma diferença entre a presença deles foi observada entre os cariótipos de machos e fêmeas da espécie (Figura 3, box).

Os homólogos do par dois foram classificados como cromossomos ligados ao sexo, sendo nos machos dois metacêntricos de mesmo tamanho (ZZ) e nas fêmeas um metacêntrico (Z) e um submetacêntrico (W), ambos de médio tamanho (Figura 3).

O bandamento C revelou blocos heterocromáticos acumulados em porção centromérica de todos os cromossomos de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, além de marcações próximas a região terminal de alguns pares. Adicionalmente, um bloco conspicuo de heterocromatina constitutiva foi observado na região pericentromérica do braço longo do cromossomo Z, enquanto o cromossomo W se mostrou completamente heterocromático. Todos os supranumerários presentes na espécie também foram considerados totalmente heterocromáticos (Figura 3b e d).

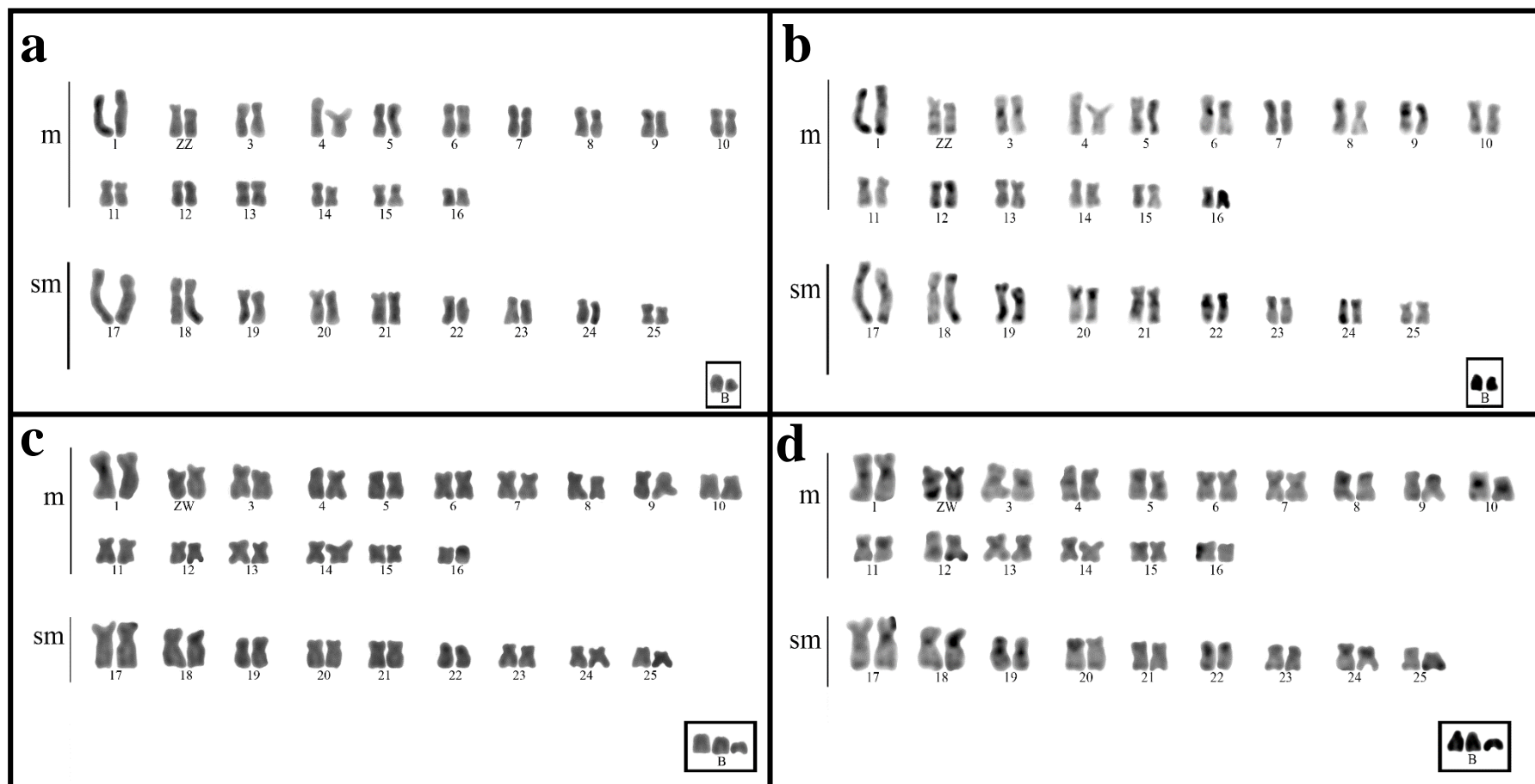


Figura 3: Cariótipos de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Colocação com Giemsa e bandamento C sequencial em fêmea (a); (b) e macho (c); (d). Os cromossomos B presentes nas espécimes estão destacados nos boxes.

Mapeamento físico de sondas de DNA repetitivo

A técnica de FISH mostrou as sequências de histonas H3 (verde) e H4 (vermelho) clusterizadas em sintenia na região pericentromérica do braço curto no par 10 de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Figura 4).

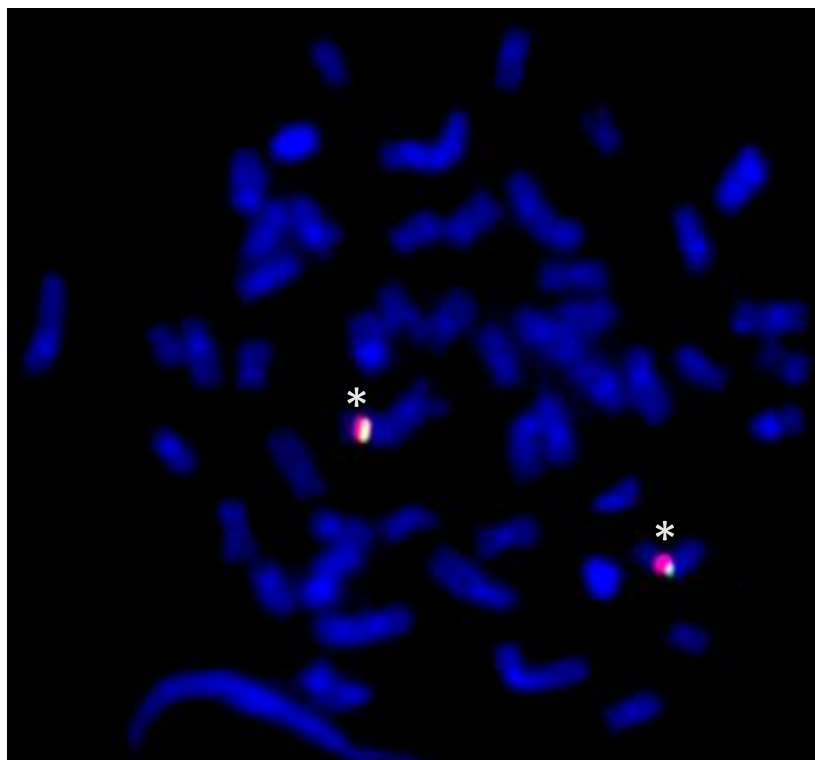


Figura 4: Metáfase de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* após double-FISH com sonda de histona H3 (verde) e H4 (vermelho). Os asteriscos destacam o par 10 marcado com a sintenia.

Já o mapeamento físico dos quatro microssatélites (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅ e (TTA)₁₅ mostrou um acúmulo preferencial dessas sequências pelas regiões subteloméricas dos cromossomos do complemento A, não havendo diferenças entre as marcações dos cariótipos de machos e fêmeas. Em adição, os supranumerários apresentados pela espécie mostraram evidentes marcações dos quatro motivos (Figura 5a, b, c, d).

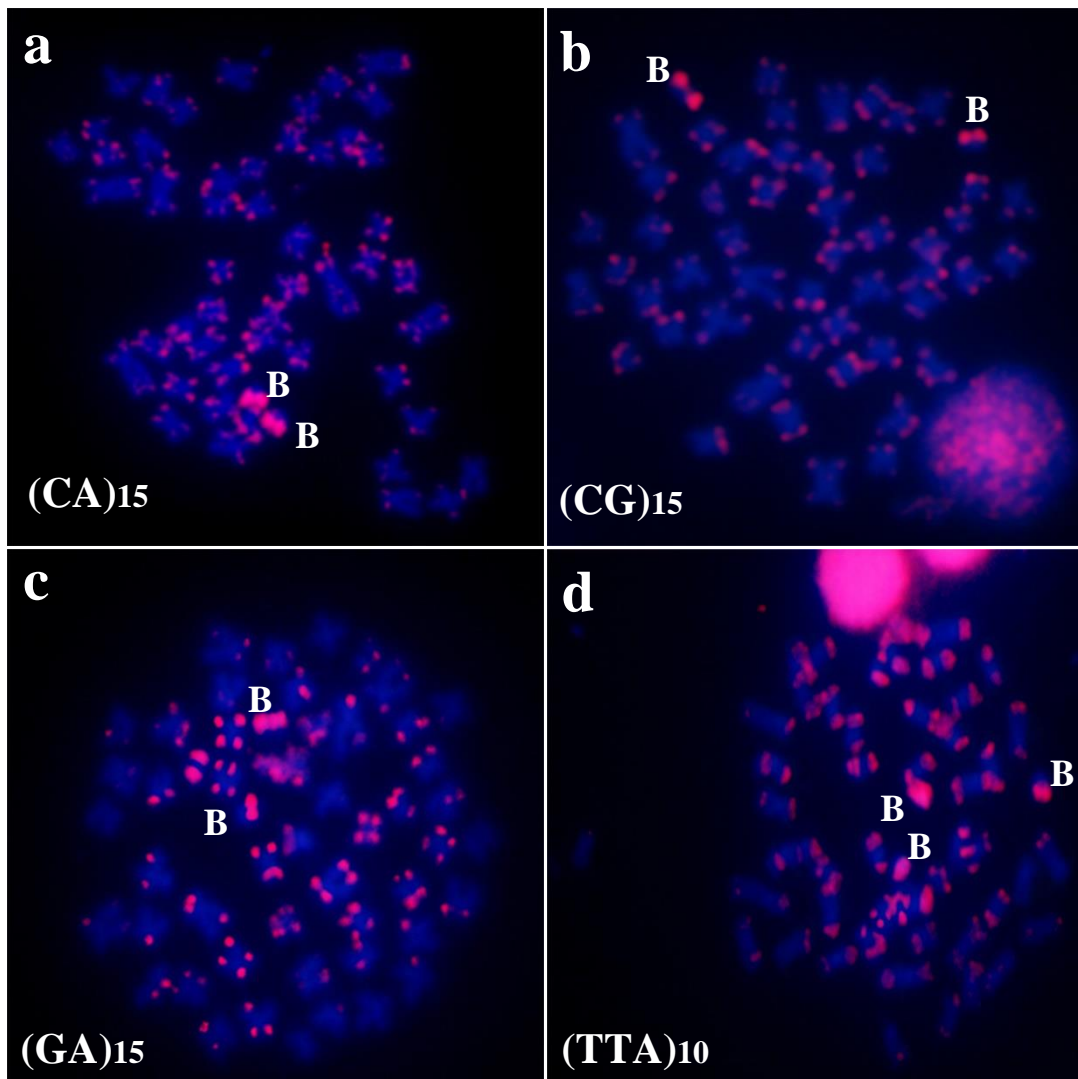


Figura 5: Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com quatro motivos de microsatélites em metáfases de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Em destaque estão os cromossomos B presentes na espécie.

Quanto as marcações com sonda telomérica (TTAGGG)_n, *Characidium* sp. aff. *C. vidali* mostrou sinais de hibridação nas porções terminais de todos os cromossomos do cariótipo, incluindo os supranumerários (Figura 6a). Adicionalmente, sítios ITSs (em regiões pericentroméricas de quatro pares cromossômicos) e double-ITSs (em porções intesticias do braço curto de dois pares cromossômicos) foram também observados no cariótipo em estudo (Figura 6a). A técnica de bandamento C sequencial a FISH mostrou que essas regiões dos ITSs (Sítios Teloméricos Intersticiais) foram coincidentes com blocos de heterocromatina constitutiva, enquanto as marcações de double-ITS foram banda C negativas (Figura 6a, b). Já os cromossomos B apresentaram as marcações de (TTAGGG)_n apenas nas porções terminais, e são totalmente heterocromáticos como revelado pela técnica de bandamento C (Figura 6a,b).

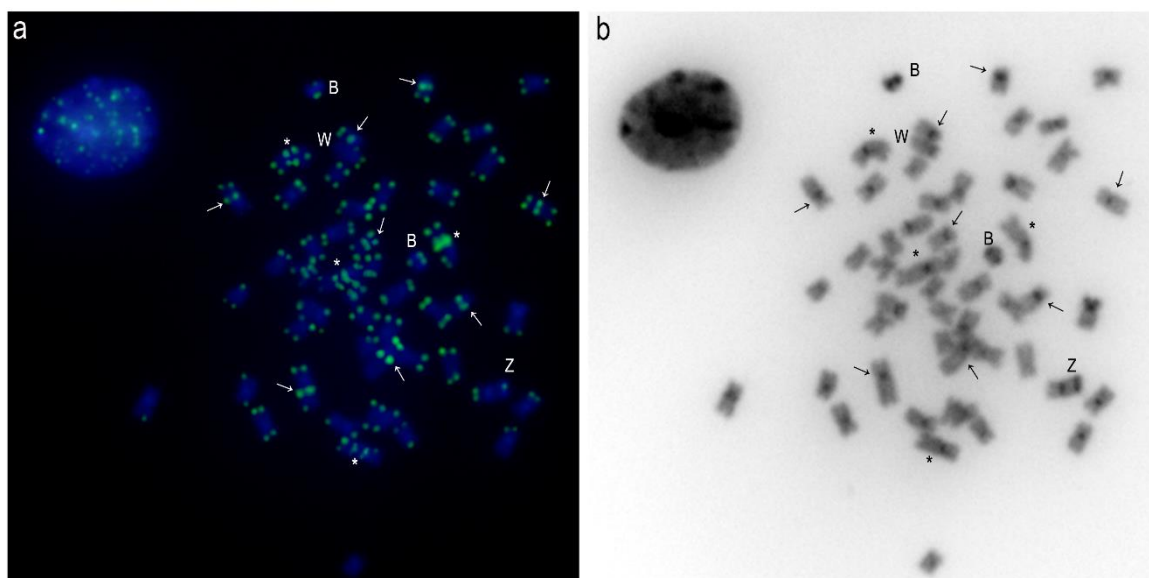


Figura 6: Metáfase de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* após hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica (TTAGGG)_n (a) e bandamento C sequencial (b). As setas indicam os sítios ITS (Intersticial Telomeric Sites) e os asteriscos destacam as marcações dos double-ITS. B = cromossomos B; Z, W = cromossomos sexuais.

Discussão

No presente estudo, a estrutura cariotípica apresentada por todos os espécimes de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* foi a mesma já descrita por Scacchetti et al. (2015b), com número diploide de 50 cromossomos (32m + 18sm), heteromorfismo sexual do tipo ZZ/ZW e presença de cromossomos B variando de 1 até 4 por célula. Em geral, os peixes do gênero *Characidium* são conhecidos por apresentar um cariótipo bastante conservado, com $2n = 50$ cromossomos, divididos em metacêntricos e submetacêntricos. A ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante

et al. 2001, 2003; Noieto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2014), presença de cromossomos supranumerários (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, 2011b, 2014; Scacchetti et al. 2015b; Serrano et al. 2017), variação da distribuição de sequências de DNA repetitivo (Vicari et al. 2008; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011a, 2014; Scacchetti et al. 2014, 2015a; Serrano et al. 2017; Pucci et al. 2018) e ocorrência de triploidia natural (Centofante et al. 2001; Pansonato-Alves et al. 2011b), são características particulares já observadas em algumas espécies de *Characidium*. Essas características podem ser consequência da ecologia destes peixes, que tendem a formar populações pequenas e isoladas em cabeceiras de riachos (Caramaschi 1986; Maistro et al. 1998), ocorrendo maior probabilidade de rearranjos cromossômicos se fixarem na população.

Nossos resultados de bandamento C também corroboram Scacchetti et al. (2015b), com a presença dos blocos heterocromáticos concentrados na região centromérica de todos os cromossomos da espécie, o bloco conspícuo no braço longo que caracteriza o cromossomo Z, e o cromossomo W totalmente heterocromático, assim como todos os cromossomos B presentes. O mapeamento físico com sondas de histonas H3 e H4 mostrou que, em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* estes genes estão colocalizados no braço curto do par 10, o que também foi observado por Pucci et al. (2018) em uma população de *Characidium zebra* e uma população de *Characidium gomesi* (ambas do riacho Paiol Grande), enquanto na população de *Characidium gomesi* oriunda do Rio São João os autores encontraram os dois clusters juntos no braço curto do par 5. Adicionalmente, Serrano et al. (2017) já haviam evidenciado a histona H3 também clusterizada no par 10 de *Characidium alipioi*, porém, a marcação foi observada no braço longo. Os genes histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) formam uma complexa família multigênica, codificante de proteínas básicas (Eirín-López et al 2009), porém em peixes a organização dessas sequências ainda é pouco estudada, sendo alguns destes genes descritos como conservados em alguns grupos, como H1 em *Astyanax* (Hashimoto et al. 2011) e *Pseudoplatystoma* (Hashimoto et al. 2013), H3 em *Hypostomus* (Pansonato-Alves et al. 2013) e H1, H3, H4 em *Astyanax bockmanni* (Silva et al. 2013). Em *Characidium*, o que se pode observar é que os genes de histona H3 e H4 tendem a estar colocalizados, e geralmente no par 10, e as variações observadas em *C. alipioi* (Serrano et al. 2017) e *C. gomesi* – população do Rio São João (Pucci et al. 2018), são consequências de rearranjos estruturais nestes cromossomos. Tais evidências agregam informações para o que se tem discutido sobre o cariótipo do gênero *Characidium*, que embora estes peixes mantenham

uma macroestrutura bem conservada, a microestrutura cromossômica pode se alterar dentro das populações e/ou espécies.

Os quatro microssatélites mapeados no presente estudo mostraram padrões de marcações bastante similares no cariótipo de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e o acúmulo preferencial dessas sequências pelas porções subteloômicas da maioria dos cromossomos já foi observada não apenas dentro do gênero (Scacchetti et al. 2015a; Serrano et al. 2017), como em outros Characiformes (Cioffi et al. 2011, 2012; Poltronieri et al. 2013; Terencio et al. 2013), podendo representar o padrão comum do grupo. Na maioria dos eucariontes, a distribuição dos microssatélites ocorre de forma não randômica, e por serem sequências altamente repetitivas, têm facilidade de se acumular em regiões heterocromáticas do genoma, onde a taxa de crossing-over é reduzida (Lohe et al. 1993; Cuadrado e Jouve 2011; Pathak e Ali 2012). Em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, as regiões do complemento A marcadas pelos sítios SSR são banda C negativas, pois como já é conhecido da maioria dos characidiuns, o acúmulo de heterocromatina constitutiva está nas porções centroméricas e/ou pericentroméricas (Miyazawa et al. 1994), diferentemente dos cromossomos B deste estudo, que apresentaram clusters bem evidentes dos quatro motivos, e são cromossomos totalmente heterocromáticos.

O acúmulo de sequências repetitivas no genoma, pode conferir mudanças estruturais nos cromossomos e o mapeamento dessas regiões no DNA pode proporcionar informações sobre a origem, estruturação, organização e até mesmo função de cromossomos específicos (Ruiz-Ruano et al. 2014). Nesse sentido, muitos trabalhos têm tentado investigar a localização de sequências de microssatélites em cromossomos ligados ao sexo, com o intuito de compreender sobre a participação desses repetitivos no processo de diferenciação dos cromossomos (Kubat et al. 2008; Poltronieri et al. 2013; Ziemniczak et al. 2014; Scacchetti et al. 2015a, b). No caso de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* o acúmulo dos quatro motivos destacou os cromossomos B da espécie, o que pode ser explicado pela baixa taxa de recombinação destes supranumerários, e como já dito anteriormente, pelo fato de serem totalmente heterocromáticos (Cuadrado e Jouve 2011; Lohe et al. 1993). Porém, estes mesmos motivos foram mapeados em *Characidium gomesi* (Scacchetti et al. 2015a), assim como sequências de (CA)₁₅ e (GA)₁₅ em *C. alipioi* (Serrano et al. 2017), e embora as duas espécies também sejam portadoras de cromossomos B (heterocromáticos), não foram observados clusters de nenhum microssatélite em seus supranumerários. Isso indica que os cromossomos B das três espécies diferem quanto ao grau de enriquecimento heterocromático, e provavelmente em

Characidium sp. aff. *C. vidali* os quatro motivos tenham se acumulado após o estabelecimento dos supranumerários no cariótipo da população.

A distribuição dos microssatélites pelo genoma de uma população pode ser atribuída a diferentes eventos como: *crossing-over* desigual, recombinação ectópica, reparo de DNA ou *slippage* e elementos transponíveis (Dover 1993; McMurray 1995; Hancock 1996, Ruiz-Ruano et al. 2014). No caso de *Characidium*, acreditamos que o espalhamento dos microssatélites ocorreu por recombinação ectópica, pois Pucci et al. (2018) mapearam elementos transponíveis em algumas espécies do gênero, e observaram um baixo acúmulo dessas sequências nos genomas. Adicionalmente, o padrão similar de marcação dos microssatélites nas regiões subterminais dos cromossomos de *Characidium*, pode ser mais uma evidência da homogeneidade macroestrutural dos cariótipos.

No genoma dos vertebrados a localização das sequências teloméricas também agrega conhecimento sobre a estruturação cromossômica das espécies. Tais sequências são constituídas por seis nucleotídeos (TTAGGG)_n que se repetem em tandem (Meyne et al. 1990; Guerra et al. 2004), e o presente estudo mostra pela primeira vez o mapeamento físico destes sítios em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Os resultados apresentaram marcações da sonda telomérica na região terminal de todos os cromossomos da espécie, incluindo os supranumerários, e isso pode ajudar a explicar porque estes cromossomos extras estiveram presentes (mesmo com variação numérica) em todas as células analisadas. Provavelmente estes cromossomos já estejam bem estabelecidos nessa população de *Characidium*, e a presença das sequências teloméricas confirma integridade a eles, protegendo de possíveis danos ao seu DNA, como é a função dos telômeros (Zakian 1995; de Lange 2005; Palm e de Lange 2008; Luke e Lingner 2009; Chan e Chang 2010; Feuerhahn et al. 2010; O'Sullivan e Karlseder 2010).

Adicionalmente, as marcações de sítios teloméricos observadas em regiões pericentroméricas do cariótipo de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* são conhecidas por sítios teloméricos intersticiais (ITS), e também já foram encontrados em outras espécies do gênero (Scacchetti et al. 2014), embora o número de homólogos marcados não seja o mesmo entre as espécies. Após bandamento C, essas regiões cromossômicas (ITS – sítios teloméricos intersticiais) mostraram blocos heterocromáticos conspícuos na espécie em estudos, e de acordo com Ruiz-Herrera et al. (2008) essa colocação pode ser chamada de het-ITS. Quando os sítios teloméricos são marcados em regiões enriquecidas por heterocromatina constitutiva, são capazes de se comportar como componentes de DNA

satélites, contribuindo para o espalhamento dessas sequências em regiões cromossômicas mais internas (Pagnozzi et al. 2000, 2003; Metcalfe et al. 2004; Scacchetti et al. 2014). Isso explica a diferença quanto ao número de ITS presentes na espécie em estudo e as seis espécies de *Characidium* estudadas por Scacchetti et al. (2014)

Outro ponto interessante, são as marcações de double-ITS presentes no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Tais marcações podem ser consequência de uma ação da enzima telomerase e/ou transposição de fragmentos teloméricos para reparar possíveis quebras na dupla-fita de DNA (Nergadze et al. 2007). Como a espécie do presente estudo apresentou os sítios ITS marcados em regiões heterocromáticas (que são consideradas “hot spots”), isso facilitaria a ocorrência de quebras cromossômicas (Ashley e Ward 1993), porém, como um mecanismo de “manutenção”, a enzima telomerase pode ter adicionado sequências de (TTAGGG)_n intersticialmente no braço longo dos mesmos homólogos, para evitar que rearranjos estruturais modifiquem a macroestrutura cariotípica da espécie.

Desde os relatos de Meyne et al. (1990), muitos estudos têm buscado identificar e compreender melhor a dispersão de sequências teloméricas localizadas internamente nos cromossomos dos organismos (Pagnozzi et al. 2000, 2003; Bolzan e Bianchi 2006; Lin e Yan 2008; Ruiz-Herrera et al. 2008; Cioffi et al. 2010b; Scacchetti et al. 2014). Geralmente, esses sítios são resquílios de rearranjos cromossômicos: fissões, fusões, translocações ou inversões, e tais eventos podem modificar a estrutura cariotípica do táxon (Holmquist e Dancis 1979; Hastie e Allshire 1989; Meyne et al. 1990; Pagnozzi et al. 2003; Cioffi et al. 2010), porém, em alguns casos ocorre a variação do número e estrutura cromossômica, sem evidências de sítios ITS, e isso indica que as sequências de (TTAGGG)_n foram eliminadas durante a evolução do genoma (Ocalewicz et al. 2013).

Para *Characidium* fica evidente que as marcações teloméricas intersticiais não evidenciam rearranjos cromossômicos estruturais, já que o gênero é conhecido por manter um cariótipo macroestruturalmente homogêneo. Nas investigações de Scacchetti et al. (2014), os autores propõem que as espécies de *Characidium* com sítios ITS pertencem à um pequeno grupo relacionado filogeneticamente, e o espalhamento dessas marcações dentro dos genomas seria consequência de eventos de transposição e/ou recombinação ectópica. Nossos resultados em relação ao mapeamento físico das sequências teloméricas em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* foram bem semelhantes aos apresentados pelas espécies do grupo monofilético em Scacchetti et al. (2014).

Com base em tudo o que foi exposto no presente trabalho, o mapeamento físico de diferentes sequências repetitivas resultou em novas informações para comparação genômica sobre a estruturação cariotípica dessa espécie de *Characidium*. Além disso, essas novas informações irão agregar quanto a evolução cariotípica dos peixes pertencentes a este gênero, pois de acordo com nossos resultados, muitos eventos estão ocorrendo e modificando sua microestrutura genômica, porém, a macroestrutura cromossômica continua se mantendo.

3.2 Capítulo 2

Ferramentas citomoleculares e filogenéticas indicam origem interespecífica de cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*

Introdução

É comum aos peixes do gênero *Characidium* apresentar um cariótipo bastante conservado, tanto em relação ao número diploide, quanto à fórmula cariotípica (Miyazawa & Galetti 1994; Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Silva e Maistro et al. 2006; Vicari et al. 2008; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010a, 2010b, 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015a, 2015b, Serrano et al. 2017, 2019). Alguns trabalhos têm reportado espécies de *Characidium* ocorrendo em simpatria, compartilhando da macroestrutura cromossômica comum ao grupo, porém, diferindo em algumas características cariotípicas microestruturais, como por exemplo: presença e/ou ausência de sistema sexual e de cromossomos B, estruturação dos blocos heterocromáticos e marcação dos sítios das regiões organizadoras de nucléolos (Centofante et al. 2001, 2003; Silva e Maistro 2006; Pansonato-Alves et al. 2010; Scacchetti et al. 2015). Recentemente, Serrano et al. (2019) descreveram dois morfotipos de *C. alipioi* em condição simpátrica no rio Paraíba do Sul, e embora apresentassem características citogenéticas muito semelhantes, análises filogenéticas moleculares mostraram se tratar de duas espécies distintas.

Espécies de *Characidium* são comuns em cabeceiras de riachos, e como geralmente constituem populações pequenas e isoladas, aumentam as chances de ocorrer especiação alopátrica. Conseqüentemente, eventos como captura de cabeceiras de riachos explicam os casos de simpatria entre as espécies (Poveda-Martinez et al. 2016; Pucci et al. 2014). Scacchetti et al. (2015b) reportaram *C. vidali* e *Characidium* sp. aff. *C. vidali* coexistindo em um riacho de Silva Jardim, Rio de Janeiro, porém, apenas a segunda espécie apresentou cromossomos B em seu cariótipo.

Os cromossomos B são também conhecidos como supranumerários, e considerados elementos extras ao complemento padrão A (Camacho et al. 2000). Estes cromossomos se caracterizam por apresentarem um caminho evolutivo próprio, pois não seguem as leis de herança Mendeliana e não se recombinam com os cromossomos do complemento A (Camacho et al. 2000). Devido ao seu comportamento meiótico incomum, e por serem de natureza dispensável ao genoma, os cromossomos B foram

caracterizados como parasitas genéticos, sem conferir vantagem ao hospedeiro (Camacho et al. 2005). Porém hoje já se sabe que cromossomos B podem estar associados à fertilidade (Camacho et al. 2000), conferir resistência a antibióticos e aumentar a patogenicidade, como no fungo *Nectria haematococca* (Coleman et al. 2009), ou ainda a frequência dos supranumerários estar associada com o sexo em ciclídeos (Yoshida et al. 2011).

Já foram observados em fungos, plantas e animais (Navas-Castillo et al 1985; Alfenito e Birchler 1993; Covert 1998), e muitos trabalhos tentam compreender como estes cromossomos se originam, como evoluem no genoma hospedeiro e se há compartilhamento de sequências com o complemento A (Camacho et al. 2000; Bugrov et al. 2007). Em peixes, diferentes espécies já foram descritas portando cromossomos B em seus cariótipos, e compondo o DNA destes supranumerários autores já observaram desde sequências de DNA satélites, genes ribossomais, elementos transponíveis, além de genes histonas (Paus e Bertolo 1983; Mestriner et al. 2000; Artoni et al. 2006; Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011; Ziegler et al. 2003; Hashimoto et al. 2012; Silva et al. 2014; Utsunomia et al. 2016).

Dentro do gênero *Characidium* ainda são poucas as espécies descritas portando cromossomos B (Miyazawa e Galetti 1994; Maistro et al. 1998; 2004; Pansonato-Alves 2010; Pansonato-Alves et al. 2011; Scacchetti et al 2015b; Serrano et al. 2017, 2019). Como estes cromossomos reportaram diferenças quanto à morfologia e acúmulo de heterocromatina constitutiva, Pansonato-Alves et al. (2014) propuseram que neste grupo de peixes a origem dos supranumerários tenha ocorrido de maneira independente em cada população. Alguns autores conseguiram aprofundar seus estudos e mostraram que dentro de *Characidium* os cromossomos B podem ter tanto origem intraespecífica como em *C. gomesi*, *C. pterostictum* (Pansonato-Alves et al. 2014) e *C. alipioi* (Serrano et al. 2017), quanto interspecífica, como em *C. oiticiai* (Pansonato-Alves et al. 2014).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar a possível origem dos cromossomos B na espécie *Characidium* sp. aff. *C. vidali*.

Materiais e Métodos

Os procedimentos para coleta, manutenção e análise dos peixes foram efetuados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

(CONCEA), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Protocolo nº 971 – CEUA – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado de 20 exemplares de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*) preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante. A relação dos táxons analisados com informações de vouchers e localidades encontram-se na Tabela Anexo 1.

Para identificação molecular das amostras de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, foi realizada amplificação por PCR do fragmento do gene *citocromo oxidase c subunidade I* (*COI*), utilizando os primers Fish-F1 e FishR1 (Ward et al. 2005). A reação de PCR foi montada utilizando: 1,25µl 10x PCR Buffer, 0,5µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl dNTP mix, 0,25µl de cada primer (10mM), 1,0µl de DNA da espécie, 0,2µl de Taq polimerase PHT e 11,20µl de H₂O destilada, com um volume final de 15,1µl. O programa utilizado para essa reação foi de 3 min à 95°C (denaturação inicial), 30s à 95°C (denaturação), 45s à 52°C (anelamento), 1min à 68°C (extensão), e 10min à 68°C (extensão final). Os fragmentos amplificados foram observados em gel de agarose 1%, e em seguida purificados com ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos foram sequenciados utilizando BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard Version 3.1 Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems), na Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

O programa Geneious v4.8.5 (Kearse et al. 2012) foi utilizado para construir e editar as sequências consensos. Posteriormente, foi realizado um BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) de cada sequência para uma identificação inicial das espécies.

Alinhamento e análise de distância genética

Após a identificação molecular dos 20 espécimes de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, essas sequências foram incorporadas à maior matriz de barcoding de *Characidium* já publicada com 121 táxons (Serrano et al. 2019). Foram adicionadas à esta matriz mais quatro sequências de *Characidium* obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *C. timbuiense* (KM229365), *C. serrano* (KM229364), ambas obtidas por Scacchetti et al.

(2014), *C. lanei* (KF914702) obtida por Pansonato-Alves et al. (2014) e *C. vidali* (KM229367) obtida por Scacchetti et al. (2015). A matriz final (146 táxons; 552 pb) foi alinhada com o algoritmo Muscle (Edgar 2004) implementado no Geneious v4.8.5 utilizando parâmetros em *default*.

Para verificar o índice de saturação dos nucleotídeos, foi utilizado o software DAMBE v7 (Xia 2018). O cálculo das distâncias genéticas foi realizado no MEGA v7.0 (Kumar et al. 2016), onde as sequências foram divididas em grupos de espécies, e utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) com 1000 pseudoréplicas de bootstrap. Os 18 grupos representando espécies ou linhagens foram ordenados baseados nas topologias obtidas pela análise de distância. Foram obtidas a distância média (entre todas as espécies), distância interespecífica (entre os grupos de espécies) e distância intraespecífica (entre os indivíduos de cada grupo). Finalmente, foi construída uma árvore de neighbor-joining (NJ) com 1000 pseudoréplicas de bootstrap utilizando o programa MEGA v7.0.

Análise de máxima verossimilhança

Para obtenção da melhor árvore de máxima verossimilhança, foi utilizado o RAxML PTHREADS–SSE3, implementado no RAxML v8.019 (Stamatakis 2014). Essas análises foram executadas no super-servidor *Brycon* do Instituto de Biociências, UNESP Botucatu. Foram realizadas cinco inferências na matriz original para obtenção da melhor árvore de máxima verossimilhança, usando o modelo GTRGAMMA (Stamatakis et al. 2008), e pseudoréplicas de bootstrap não paramétricas, através do autoMRE, com base no critério de bootstopping (Pattengale et al. 2009), o que resultou em um total de 500 pseudoréplicas. Ao final, foi realizada uma reconciliação, onde os valores de bootstrap foram adicionados à melhor árvore obtida. Para a visualização da topologia consenso foi utilizado o programa FigTree v1.4.3.

Análises citomoleculares

Microdissecção e preparação das sondas dos cromossomos B

A microdissecção dos cromossomos B foi realizada com o auxílio de um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2, acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100, a partir de uma preparação citogenética de um indivíduo fêmea de *Characidium*. sp. aff. *C. vidali*. Foram preparadas duas sondas, para a primeira foi isolado

apenas um microcromossomo B, e a sonda produzida a partir dele foi nomeada CvB. Já para a outra sonda, foram isolados 8 microcromossomos B (pool), e essa segunda sonda produzida foi chamada de CvBp. O protocolo utilizado para a microdissecção foi de acordo com Mühlmann et al. (1995), com pequenas adaptações, e para a amplificação inicial dos cromossomos microdissecados foi utilizado o Kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification WGA4-Sigma (Gribble et al 2004). As sondas (CvB e CvBp) foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science), com o Kit Genome Plex Whole Genome Amplification Reamplification WGA3-Sigma, de acordo com o fabricante.

Pintura cromossômica com sonda CvBp

A técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente foi conduzida de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986). A pintura cromossômica com sonda de CvBp foi realizada em lâminas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, *C. alipioi*, *C. gomesi*, *C. vidali*, *C. pterostictum*, *C. timbuiense* e *C. serrano*.

As lâminas passaram por uma lavagem inicial em PBS 1x (5 minutos – à temperatura ambiente) e desidratação em série alcoólica. Em seguida foram incubadas em RNase (5ug/ml) à 37°C durante 1 hora. Foram também tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM (10 minutos) à 37°, lavagem em PBS 1x à temperatura ambiente (5 minutos) e fixadas em formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM (10 minutos) à temperatura ambiente. Então, foram novamente lavadas em PBS 1x (5 minutos), desidratadas em série alcoólica e denaturadas em formamida 70%/2xSSC por 5 minutos. Simultaneamente, o mix de hibridação (sulfato dextrano 10%, formamida 50%, 20xSSC, sonda e água foi denaturado à 95° (10 minutos), e ao final, 30µl desse mix foi pingado em cada lâmina, que permaneceram incubadas *overnight* à 37°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em 0,4xSSC/0,3% Triton por 5 minutos à 73%, em 2xSSC/0,1% Triton por 30 segundos à RT, bloqueadas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos à RT e novamente lavadas em Triton 0,5%/4xSSC. A detecção das sondas foi feita com anti-digoxigenin-rhodamina; e ao final, todas as lâminas foram coradas com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif, USA). Para análise foi utilizado um fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens obtidas a partir do software image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Md.,USA).

Após a realização da pintura cromossômica, foi feito bandamento C sequencial, para identificação dos cromossomos sexuais e/ou supranumerários das espécies já que os

mesmos apresentam morfologia muito similares (porém, no presente estudo mostramos apenas os resultados obtidos em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*).

Resultados

Análises moleculares e filogenéticas

Após a realização do BLASTn das 20 sequências obtidas no presente estudo, quatro deram homologia com sequências de *Characidium vidali* depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), enquanto dezesseis delas mostraram homologia com outras espécies do gênero, indicando a inexistência de sequências dessa espécie depositadas, o que dificulta sua identificação. De acordo com os dados citogenéticos apresentados no Capítulo 1, os dezesseis exemplares não identificados molecularmente no presente estudo apresentaram cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis em todas as suas células, enquanto no cariótipo dos espécimes aqui identificados como *C. vidali*, apenas $2n = 50$ cromossomos foram encontrados (dados não apresentados no Capítulo 1). Sendo assim, essas 16 sequências foram nomeadas aqui como *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. A matriz final obtida reuniu 146 táxons e 552 pb (Tabela 1, Anexo). O DAMBE não evidenciou saturação, tanto nas transições quanto nas transversões, tanto na topologia simétrica (Iss cSym) como na topologia assimétrica (ISS cAsym).

A distância total média foi de 0,085, e a distância genética intraespecífica variou de 0,000 dentro de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, *C. vidali*, *C. shubarti*, *C. oiticicai* e *C. alipioi* A, a 0,011 dentro de *C. zebra* e *C. lagsantense*. As espécies *Characidium lanei*, *C. serrano* e *C. timbuiense* estiveram representadas apenas por uma sequência em cada grupo, portanto sem valores intraespecíficos. Nas distâncias interespecíficas, destacamos que entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. alipioi* A foi de 0,102; entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. gomesi* foi de 0,141; *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. vidali* foi de 0,105; entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. pterostictum* foi de 0,022; entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. timbuiense* foi de 0,017 e entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. serrano* foi de 0,020 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de distância genética entre linhagens de *Characidium* (diagonal inferior) e valores de desvio padrão (diagonal superior). Em negrito estão representados os valores K2P de distância genética intraespecífica. Os grupos foram organizados de acordo com as análises de máxima verossimilhança.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 <i>Crenuchus spirulus</i>	-	0,025	0,024	0,024	0,024	0,024	0,023	0,023	0,023	0,024	0,024	0,025	0,023	0,026	0,024	0,024	0,025	0,027
2 <i>Characidium zebra</i>	0,258	0,011	0,020	0,009	0,015	0,014	0,020	0,019	0,018	0,018	0,019	0,018	0,020	0,020	0,019	0,018	0,018	0,020
3 <i>Characidium lanei</i>	0,255	0,167	-	0,021	0,019	0,019	0,017	0,018	0,012	0,013	0,011	0,014	0,016	0,019	0,012	0,012	0,011	0,018
4 <i>Characidium lagsantense</i>	0,250	0,045	0,173	0,01	0,015	0,014	0,019	0,019	0,018	0,018	0,018	0,017	0,019	0,019	0,019	0,018	0,018	0,018
5 <i>Characidium rachovii</i>	0,256	0,117	0,161	0,116	0,001	0,014	0,019	0,018	0,018	0,019	0,019	0,020	0,019	0,020	0,019	0,019	0,020	0,018
6 <i>Characidium xanthopterum</i>	0,257	0,107	0,167	0,105	0,100	0,001	0,019	0,019	0,018	0,018	0,019	0,019	0,019	0,019	0,018	0,019	0,018	0,018
7 <i>Characidium gomesi</i>	0,230	0,178	0,134	0,172	0,170	0,178	0,002	0,006	0,017	0,017	0,016	0,017	0,019	0,019	0,016	0,017	0,017	0,018
8 <i>Characidium fasciatum</i>	0,225	0,176	0,140	0,166	0,166	0,178	0,022	0,001	0,017	0,016	0,016	0,017	0,018	0,018	0,017	0,017	0,017	0,017
9 <i>Characidium shubarti</i>	0,240	0,152	0,080	0,148	0,161	0,162	0,133	0,137	0,000	0,011	0,009	0,011	0,014	0,015	0,010	0,010	0,009	0,015
10 <i>Characidium lauroi</i>	0,250	0,153	0,081	0,151	0,165	0,167	0,139	0,132	0,057	0,005	0,008	0,006	0,014	0,015	0,007	0,009	0,008	0,015
11 <i>Characidium pterostictum</i>	0,242	0,159	0,066	0,154	0,172	0,163	0,131	0,132	0,044	0,037	0,004	0,010	0,014	0,015	0,006	0,007	0,006	0,016
12 <i>Characidium oiticicai</i>	0,263	0,150	0,090	0,149	0,179	0,175	0,145	0,139	0,064	0,017	0,050	0,000	0,014	0,016	0,007	0,009	0,008	0,015
13 <i>Characidium alipioi B</i>	0,231	0,175	0,114	0,167	0,154	0,164	0,168	0,155	0,097	0,096	0,090	0,100	0,001	0,013	0,014	0,015	0,014	0,015
14 <i>Characidium alipioi A</i>	0,254	0,177	0,154	0,166	0,179	0,173	0,172	0,165	0,121	0,109	0,105	0,118	0,096	0,000	0,015	0,015	0,014	0,010
15 <i>Characidium serrano</i>	0,252	0,167	0,072	0,166	0,174	0,163	0,140	0,142	0,052	0,031	0,021	0,034	0,100	0,109	-	0,007	0,006	0,015
16 <i>Characidium timbuiense</i>	0,249	0,161	0,070	0,156	0,169	0,167	0,140	0,142	0,055	0,044	0,027	0,049	0,106	0,113	0,026	-	0,005	0,016
17 <i>Characidium sp. aff. C. vidali</i>	0,257	0,159	0,065	0,155	0,176	0,163	0,141	0,142	0,047	0,035	0,022	0,039	0,097	0,102	0,020	0,017	0,000	0,014
18 <i>Characidium vidali</i>	0,274	0,168	0,140	0,151	0,165	0,154	0,157	0,152	0,109	0,108	0,111	0,116	0,113	0,053	0,115	0,119	0,105	0,000

Quanto às duas topologias obtidas, não foram observadas diferenças consideráveis em relação a distribuição dos grupos de espécies. A melhor árvore de máxima verossimilhança (Figura 1) mostrou que *Characidium* sp. aff. *C. vidali* é mais próxima do grupo com *C. timbuiense* e *C. serrano* e depois com *C. pterostictum*, *C. lanei*, *C. schubarti*, *C. oiticicai* e *C. lauroi* do que com outras espécies como *Characidium alipioi*, *C. gomesi* e *C. vidali*. Adicionalmente, nessa mesma topologia, foram destacadas (em azul) as espécies que apresentaram homologia com a sonda CvBp (sonda do pool de cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*), e as espécies que não apresentaram essa homologia, foram destacadas em vermelho (Figura 1). Os resultados mostrados com a árvore de distância genética corroboram essas informações, e é importante destacar que em ambas as topologias, *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, *C. pterostictum*, *C. timbuiense* e *C. serrano* fazem parte de um grupo monofilético, juntamente com *C. lauroi* e *C. oiticicai*. (Figura 1, Anexo).

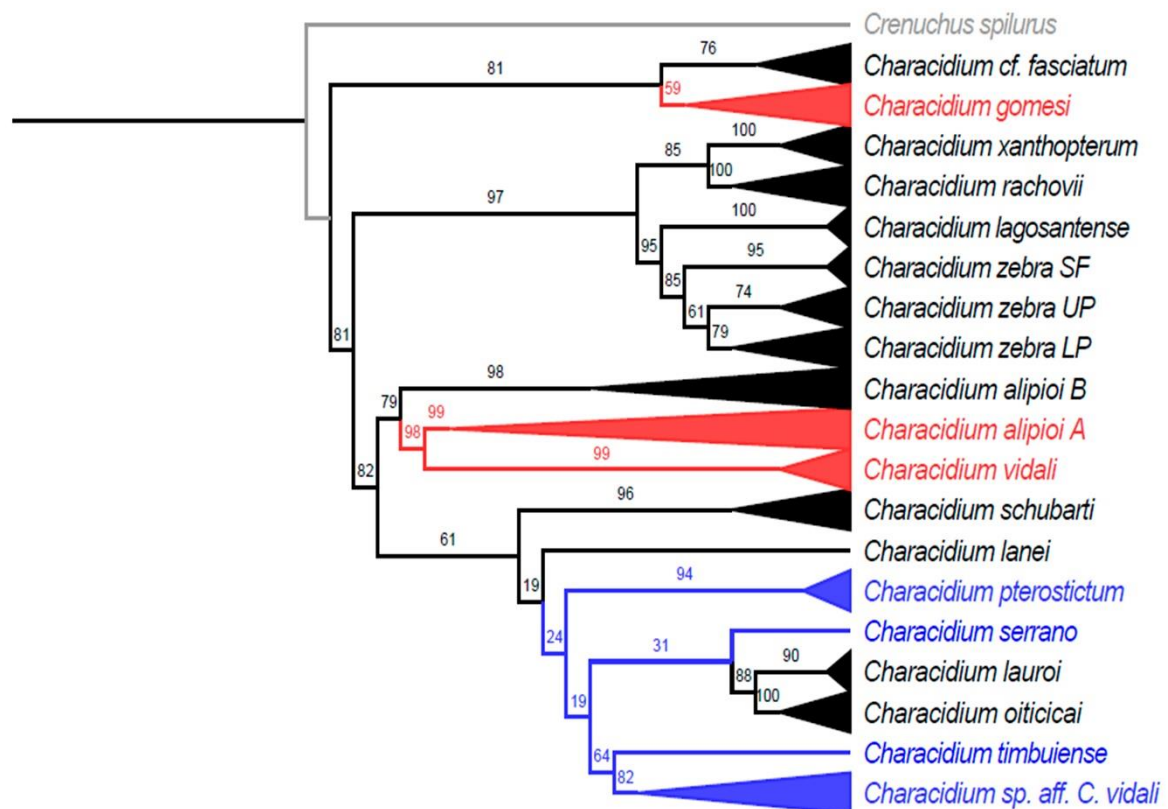


Figura 1: Melhor árvore de máxima verossimilhança com base no gene mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I*. Em vermelho estão destacadas as espécies que não tiveram homologia após pintura

cromossômica com a sonda CvBp. Em azul estão destacadas as espécies que tiveram homologia com a sonda CvBp. SF = Rio São Francisco, UP = Upper Rio Paraná, LP = Lower Rio Paraná.

Análises citomoleculares

As sondas CvB (dados não mostrados) e CvBp utilizadas na pintura cromossômica mostraram sinais de clusterização apenas nos cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, sem nenhuma homologia com os cromossomos ligados ao sexo, ou qualquer outro cromossomo do complemento A da espécie (Figura 2a). A técnica de bandamento C realizada sequencialmente à pintura, contribuiu para a identificação e confirmação dos cromossomos supranumerários e sexuais (Figura 2b).

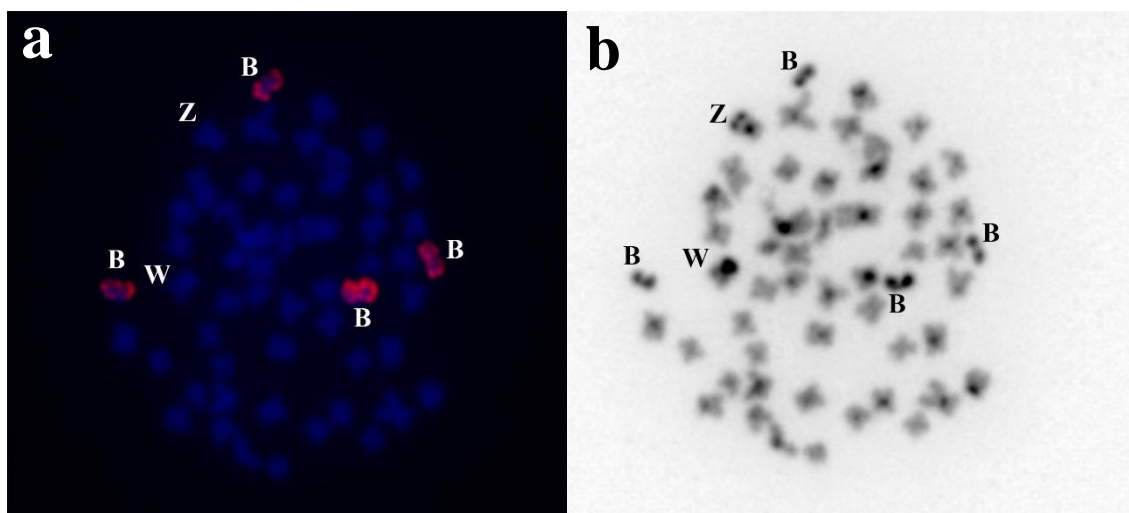


Figura 2: Metáfase de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* após pintura cromossômica com sonda do pool de B CvBp (a) e bandamento C sequencial (b). B = cromossomos B; Z, W = cromossomos sexuais.

A pintura cromossômica com a sonda CvBp em *Characidium vidali*, *C. gomesi* e *C. alipioi* A mostrou sinais de hibridação dispersos pela porção telomérica de alguns cromossomos, não sendo evidenciados sítios de clusterização em nenhum cromossomo específico das três espécies (Figura 3a, b, c). Já em *C. serrano*, *C. timbuiense* e *C. pterostictum*, além da sonda CvBp também marcar na região dos telômeros da maioria dos cromossomos, um cluster na porção pericentromérica do braço longo do par acrocêntrico foi evidenciado nas três espécies (Figura 4a, b, c).

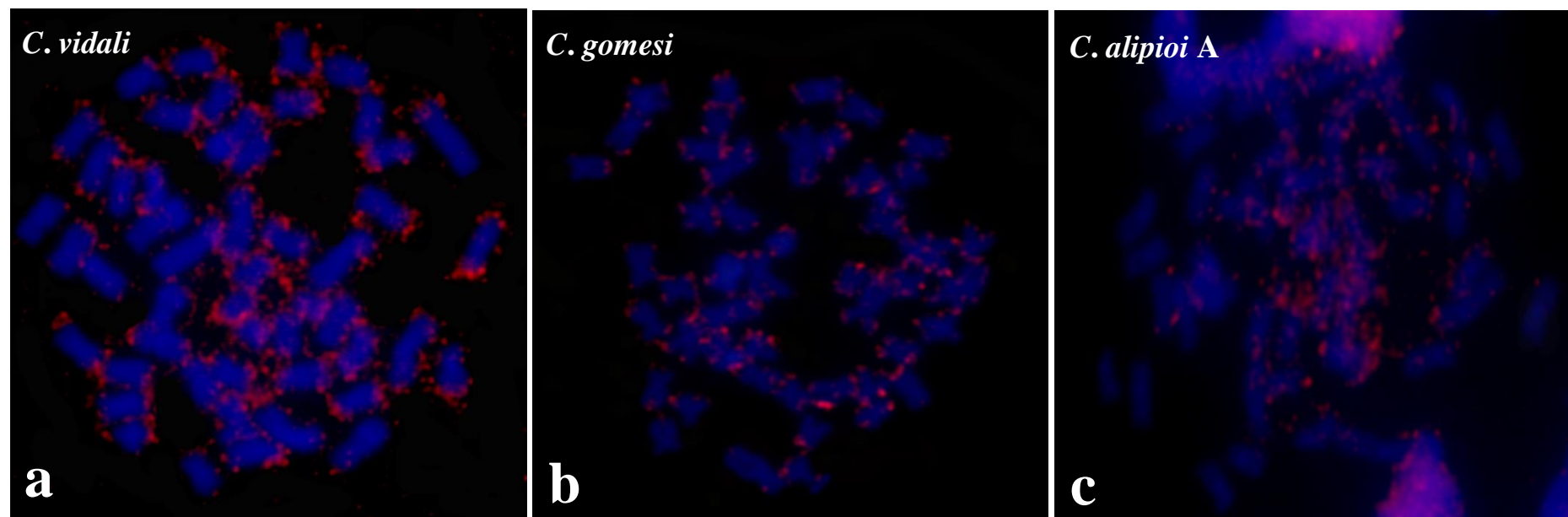


Figura 3: Metáfases de três espécies de *Characidium* após pintura cromossômica com sonda CvBp (pool de cromossomos B microdissecados de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*).

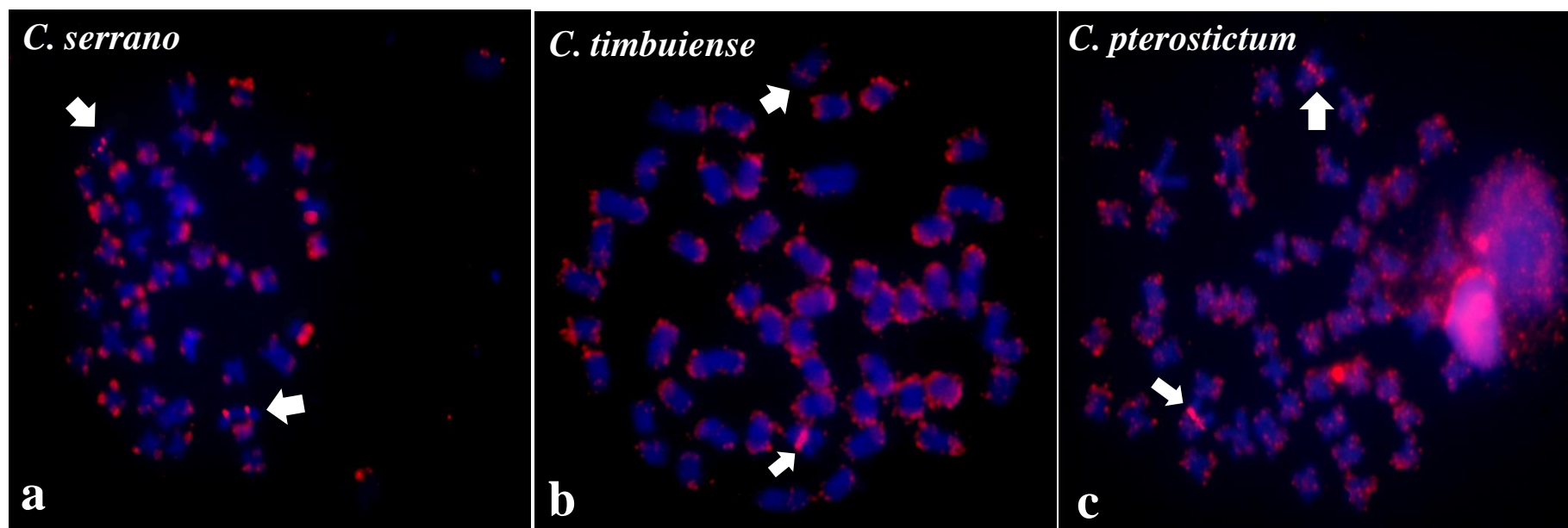


Figura 4: Metáfases de três espécies de *Characidium* após pintura cromossômica com sonda CvBp (pool de cromossomos B microdissecados de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*). As setas destacam os cromossomos acrocêntricos presentes nas espécies.

Discussão

As análises moleculares realizadas no presente estudo mostraram que *Characidium vidali* representa na verdade duas espécies que vivem em condição simpátrica. Após o BLASTn das sequências, uma espécie foi identificada como *Characidium vidali*, enquanto a outra ainda não possui sequências depositadas em bancos de dados que confirmem sua identificação, contudo, com base em caracteres morfológicos (Leitão e Buckup et al. 2014) e citogenéticos (Scacchetti et al. 2015a; Capítulo 1) foi proposto se tratar de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*.

É comum espécies de *Characidium* ocorrerem em simpatria, e na maioria das vezes apresentarem características citogenéticas diferentes entre elas, por exemplo, quando uma população tem sistema sexual e a outra não como observado em *C. cf. zebra/C. gomesi* (Centofante et al. 2001), *Characidium* sp. af. *C. alipioi/C. lauroi* (Centofante et al. 2003) e *C. oiticicai/C. cf. zebra* (Pansonato-Alves et al. 2014). Em alguns casos, os cariótipos das duas espécies podem diferir quanto a presença de cromossomos supranumerários em uma e ausência na outra, como *C. oiticicai/C. cf. zebra* (Pansonato-Alves et al. 2014), *Characidium* sp. aff. *C. vidali/C. vidali* (Scacchetti et al. 2015b, presente estudo), ou ainda quando as duas populações diferem quanto a localização das RONS *C. gomesi* e *C. cf. zebra* (Silva e Maistro 2006). O isolamento reprodutivo dessas espécies pode ser atribuído a diversos fatores ainda não investigados, porém, a co-existência das mesmas pode ser uma consequência de eventos por exemplo como capturas de cabeceiras (Poveda-Martinez et al. 2016; Pucci et al. 2014), já que os peixes do gênero *Characidium* tem facilidade em formar populações pequenas e isoladas nestes locais.

Do ponto de vista citogenético *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. vidali* apresentam algumas características em comum, como a localização dos sítios de rDNA 18S, a presença de sistema sexual do tipo ZZ/ZW, além do padrão de heterocromatinização destes cromossomos (Scacchetti et al. 2015a, b). Já quanto as marcações de rDNA 5S, as duas espécies diferem em número de sítios e localização dos clusters (Scacchetti et al. 2015a, b). Porém, a diferença cariotípica mais relevante, é a presença de cromossomos B observada apenas em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, que já havia sido relatada por Scacchetti et al. (2015b), e novamente observada no Capítulo 1 do presente estudo (cariótipo de *C. vidali* não foi mostrado em nossas análises).

Com tais informações, a princípio foi proposto que os supranumerários presentes em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* poderiam ter homologia com o cariótipo da espécie

simpátrica (*C. vidali*), agregando até mesmo informações sobre a origem destes cromossomos B. Porém, a pintura cromossômica realizada no presente Capítulo não mostrou sinais de hibridação da sonda CvBp (produzida a partir do pool de supranumerários de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*) com nenhum cromossomo de *Characidium vidali*. Além disso, as topologias obtidas aqui mostram que as duas espécies são geneticamente distantes, e não relacionadas filogeneticamente, descartando então qualquer hipótese de que a origem dos cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* teria alguma relação com o genoma de *C. vidali*, embora elas ocorram em simpatria.

Quando investigada no genoma da própria espécie (*Characidium* sp. aff. *C. vidali*), a sonda CvBp não mostrou sinais de hibridação nos cromossomos do complemento A, e marcou exclusivamente os cromossomos B do cariótipo. Porém, no presente trabalho propomos que os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* tiveram origem intraespecífica, e essa ausência de homologia pode ser consequência das grandes mudanças que os supranumerários adquirem a cada processo de replicação, diferindo assim seu conteúdo genético dos cromossomos pertencentes ao complemento padrão A. Em *Characidium* o número de espécies descritas portando cromossomos B ainda é baixo (Miyazawa & Galetti 1994; Maistro et al. 1998, 2004; Pansonato-Alves 2010, 2011; Scacchetti et al. 2015; Serrano et al. 2017), sendo *C. gomesi* e *C. pterostictum* (Pansonato-Alves et al. 2014), assim como *C. alipioi* (Serrano et al. 2017) também portadoras de cromossomos B de origem intraespecífica, e apenas *C. oiticicai* foi descritos com cromossomos B de origem interespecífica (Pansonato-Alves et al. 2014).

A pintura cromossômica com sonda CvBp também mostrou ausência de homologia com o genoma de *Characidium gomesi* (população Avaré-SP) e *C. alipioi* (Salesópolis-SP), duas espécies descritas em Serrano (2016) e Serrano et al. (2017) respectivamente, portando cromossomos B em seus cariótipos. As topologias geradas no presente estudo também revelam que não há relação genética e filogenética entre as duas espécies e *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e como já reportado por Pansonato-Alves et al. (2014), a origem dos cromossomos B em *Characidium* ocorrem de maneira independentemente.

Porém, no genoma de *Characidium serrano*, *C. timbuiense* e *C. pterostictum* a pintura cromossômica com a sonda CvBp marcou sítios espalhados pelas regiões terminais da maioria dos cromossomos das espécies, mas o que chamou a atenção foi um cluster bastante evidente na região pericentromérica do braço longo de um par acrocêntrico (presente nas três espécies). De acordo com Scacchetti et al. (2015a), em

Characidium pterostictum e *C. timbuiense* essa mesma região dos pares acrocêntricos foi marcada por sequências de quatro microssatélites, os mesmos *motifs* acumulados nos supranumerários de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, como mostrado no Capítulo 1 do presente estudo.

Adicionalmente, o mapeamento físico com sequências teloméricas (TTAGGG)_n também realizado no Capítulo 1 do presente trabalho, mostrou que no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* todos os cromossomos possuem marcações na porção terminal, além de sítios teloméricos intersticiais (ITS e double-ITS). Scacchetti et al. (2014) já haviam observado sítios ITS (sítios teloméricos intersticiais) em *C. schubarti* e *C. lanei*, enquanto *C. lauroi*, *C. timbuiense*, *C. serrano* e *C. pterostictum* apresentaram além dos ITS, também marcações de double-ITS, o que até então seria apenas mais uma característica comum entre as três últimas espécies e *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Porém, a melhor árvore de verossimilhança realizada aqui, mostra que *C. schubarti*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. serrano*, *C. lauroi*, *C. timbuiense* são de fato relacionadas com *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e que nossa espécie portadora de supranumerários faz parte de um grupo monofilético reportado em Scacchetti et al. (2014).

É sabido que a estrutura cariotípica dentro *Characidium* é altamente conservada, porém, *C. pterostictum*, *C. serrano* e *C. timbuiense* apresentam um par de cromossomos acrocêntricos (Pansonato et al. 2010; Scacchetti et al. 2014), assim como *Characidium* sp. aff. *C. vidali* possui cromossomos supranumerários (Scacchetti et al. 2015a; Capítulo 1). A árvore de distância genética realizada neste estudo também mostrou que essas quatro espécies são próximas, mais uma vez corroborando o grupo monofilético já apresentado em Scacchetti et al. (2014).

Então, partindo do princípio que *Characidium pterostictum*, *C. serrano*, *C. timbuiense* e *Characidium* sp. aff. *C. vidali* compartilham o padrão de marcações teloméricas, apresentando sítios ITS e double-ITS (Scacchetti et al. 2014; Capítulo 1), e a pintura cromossômica com a sonda CvBp destacou tanto os pares acrocêntricos de *Characidium pterostictum*, *C. serrano*, *C. timbuiense*, quanto os supranumerários de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e que estes mesmos cromossomos foram também evidenciados com sequências de quatro microssatélites (Scacchetti et al. 2015a; Capítulo 1), é possível propor que existe uma relação entre essas espécies, o que pôde ser confirmado através das análises filogenéticas obtidas neste trabalho.

Os cromossomos acrocêntricos podem ter surgido em algumas espécies de *Characidium* como consequência de inversões pericêntricas ocorridas em cromossomos

submetacêntricos, modificando a morfologia dos mesmos (Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014). De acordo com as análises citomoleculares e as topologias obtidas no presente trabalho, tais informações podem ser confirmadas e contribuem ainda para elucidar que o par acrocêntrico ancestral a *C. serrano*, *C. pterostictum* e *C. timbuiense* (Pucci et al. 2014, Pansonato-Alves et al. 2014), seria também compartilhado por *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, conforme as homologias indicadas pelas pinturas cromossômicas com sondas dos B e as hibridações com as sequências dos microssatélites. Porém, em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* este par de cromossomos acrocêntricos sofreu uma quebra horizontal na região centromérica, originando dois cromossomos metacêntricos de menor tamanho. Estes por sua vez foram se acumulando e sofrendo diversificações (acúmulo de sequências e morfologia) no genoma como os supranumerários.

Propomos aqui então, que os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* tiveram uma origem intraespecífica, sustentada pela teoria de um isocromossomo.

Anexos

Tabela 1: Táxons, vouchers, localidade e número de registro no GenBank de espécimes de *Characidium* utilizadas para análises de DNA barcode. SF = Rio São Francisco, UP = Upper Rio Paraná, LP = Lower Rio Paraná.

Taxon	Voucher	Espécime	Localidade	Cidade, Estado	País	GenBank
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 3408	20415	Rio Paraíba do Sul	Bairro dos Macacos, São Paulo	Brasil	GU702199
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 3408	20416	Rio Paraíba do Sul	Bairro dos Macacos, São Paulo	Brasil	GU702200
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 3408	20417	Rio Paraíba do Sul	Bairro dos Macacos, São Paulo	Brasil	GU702201
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 3408	20418	Rio Paraíba do Sul	Bairro dos Macacos, São Paulo	Brasil	GU702134
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 3408	20419	Rio Paraíba do Sul	Bairro dos Macacos, São Paulo	Brasil	GU702202
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25738	36084	Rio Paraíba do Sul	Sta. Bárbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	KF914705
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78709	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716095
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78710	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716096
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78712	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716097
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78713	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716098
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78716	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716099
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78718	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716100
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78720	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716101
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78721	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716102
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78722	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716103
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78723	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716104
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78724	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716105
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78727	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716106
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78731	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716107
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78732	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716108
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78738	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716109

<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78740	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716110
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78741	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716111
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78742	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716112
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78743	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716113
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78744	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716114
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78745	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716115
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78746	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716116
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78747	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716117
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78749	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716118
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78750	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716119
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78751	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716120
<i>Characidium alipioi</i> A	LBP 25740	78753	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716121
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 8378	40201	Rio Paraíba do Sul	Sta. Barbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	GU702090
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 8378	40202	Rio Paraíba do Sul	Sta. Barbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	GU702087
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 8378	40203	Rio Paraíba do Sul	Sta. Barbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	HM064986
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 8378	40204	Rio Paraíba do Sul	Sta. Barbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	HM064987
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 8378	40205	Rio Paraíba do Sul	Sta. Barbara Tugurio, Minas Gerais	Brasil	HM064988
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78711	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716122
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78714	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716123
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78717	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716124
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78719	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716125
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78725	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716126
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78726	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716127
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78728	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716128
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78729	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716129
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78730	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716130
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78733	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716131

<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78734	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716132
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78735	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716133
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78736	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716134
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78737	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716135
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78739	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716136
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78748	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716137
<i>Characidium alipioi</i> B	LBP 25739	78752	Rio Paraíba do Sul	Pindamonhangaba, São Paulo	Brasil	MH716138
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	LBP 9607	41974	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988787
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	LBP 9607	41975	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988786
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	LBP 9607	41981	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988785
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	LBP 9607	41982	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988784
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	LBP 9607	41990	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988783
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 1181	10043	Alto Rio Paraná	Botucatu, São Paulo	Brasil	JN988782
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 1380	12126	Alto Rio Paraná	Botucatu, São Paulo	Brasil	GU701839
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 6000	28408	Alto Rio Paraná	Poços de Caldas, Minas Gerais	Brasil	JN988781
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 6723	31106	Alto Rio Paraná	Botucatu, São Paulo	Brasil	KF914694
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33568	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	GU701424
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33569	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	GU701427
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33572	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	GU701422
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33592	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	KF914699
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33593	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	GU701426
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 8709	33607	Alto Rio Paraná	Avaré, São Paulo	Brasil	GU701425
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 9022	38541	Alto Rio Paraná	Poços de Caldas, Minas Gerais	Brasil	KF914707
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 25737	41988	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988780
<i>Characidium gomesi</i>	LBP 25737	41989	Alto Rio Paraná	Aporé, Goiás	Brasil	JN988779
<i>Characidium lagsantense</i>	DCC 01193	-	Rio São Francisco	Bom Despacho, Minas Gerais	Brasil	HM405083
<i>Characidium lagsantense</i>	DCC 01191	-	Rio São Francisco	Bom Despacho, Minas Gerais	Brasil	HM906012

<i>Characidium lauroi</i>	LBP 8741	35722	Atlantic coastal river	Ubatuba, São Paulo	Brasil	KF914701
<i>Characidium lauroi</i>	LBP 8741	46417	Atlantic coastal river	Ubatuba, São Paulo	Brasil	KM229366
<i>Characidium oiticicai</i>	LBP 8703	31207	Alto Rio Paraná	Salesópolis, São Paulo	Brasil	GU701448
<i>Characidium oiticicai</i>	LBP 8703	31212	Alto Rio Paraná	Salesópolis, São Paulo	Brasil	GU701449
<i>Characidium oiticicai</i>	LBP 8703	31213	Alto Rio Paraná	Salesópolis, São Paulo	Brasil	GU701446
<i>Characidium oiticicai</i>	LBP 8703	31214	Alto Rio Paraná	Salesópolis, São Paulo	Brasil	GU701447
<i>Characidium oiticicai</i>	LBP 8703	31218	Alto Rio Paraná	Salesópolis, São Paulo	Brasil	GU701445
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 8700	33509	Atlantic coastal river	Morretes, Paraná	Brasil	KF914710
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 8701	33516	Atlantic coastal river	Paranaguá, Paraná	Brasil	KF914709
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 7367	33636	Rio Ribeira de Iguape	Iporanga, São Paulo	Brasil	KF914700
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 7367	33671	Rio Ribeira de Iguape	Iporanga, São Paulo	Brasil	KF914708
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 309	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU289033
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1726	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288837
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1724	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288853
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1725	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288854
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1722	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288836
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1723	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288852
<i>Characidium rachovii</i>	MGZVP 1721	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288835
<i>Characidium rachovii</i>	UNMDPT 0289	-	Baixo Rio Paraná	Buenos Aires	Argentina	JX111702C
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31492	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	GU701440
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31498	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	GU701439
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31499	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	KF914696
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31512	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	GU701437
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31513	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	GU701442
<i>Characidium schubarti</i>	LBP 8702	31526	Alto Rio Paraná	Jaguariaíva, Paraná	Brasil	GU701441
<i>Characidium xanthopterum</i>	LBP 7254	34895	Alto Rio Paraná	Pires do Rio, Goiás	Brasil	GU701836
<i>Characidium xanthopterum</i>	LBP 7254	35896	Alto Rio Paraná	Pires do Rio, Goiás	Brasil	GU701835

<i>Characidium xanthopterum</i>	LBP 7254	34897	Alto Rio Paraná	Pires do Rio, Goiás	Brasil	GU701834
<i>Characidium xanthopterum</i>	LBP 7254	34898	Alto Rio Paraná	Pires do Rio, Goiás	Brasil	GU701837
<i>Characidium xanthopterum</i>	LBP 7286	35890	Alto Rio Paraná	Caldas Novas, Minas Gerais	Brasil	GU701833
<i>Characidium zebra</i> SF	DCC 01147	-	Rio São Francisco	Minas Gerais	Brasil	HM906013
<i>Characidium zebra</i> SF	DCC 00653	-	Rio São Francisco	Minas Gerais	Brasil	HM405088
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 2962	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288976
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 1625	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288833
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 1626	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288834
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 2961	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288975
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 1622	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288831
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 1621	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288830
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 280	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288887
<i>Characidium zebra</i> LP	MGZVP 1624	-	Baixo Rio Paraná	Rosario, Entre Rios	Argentina	KU288832
<i>Characidium zebra</i> UP	LBP 2959	19560	Alto Rio Paraná	Colômbia, São Paulo	Brasil	JN988788
<i>Characidium zebra</i> UP	LBP 2959	19561	Alto Rio Paraná	Colômbia, São Paulo	Brasil	JN988789
<i>Characidium zebra</i> UP	LBP 2959	19562	Alto Rio Paraná	Colômbia, São Paulo	Brasil	JN988790
<i>Characidium zebra</i> UP	LBP 8718	33541	Alto Rio Paraná	Botucatu, São Paulo	Brasil	KF914698
<i>Characidium zebra</i> UP	LBP 8711	33739	Alto Rio Paraná	Botucatu, São Paulo	Brasil	KF914703
<i>Crenuchus spilurus</i>	LBP 4275	23869	Rio Negro, Amazonas	Barcelos, Amazonas	Brasil	KF914693
<i>Characidium serrano</i>	LBP 19038	62715	Córrego Canoinha	São Nicolau/Pirapó, Rio de Janeiro	Brasil	KM229364
<i>Characidium lanei</i>		33730	Rio Cari	Morretes, Paraná	Brasil	KF914702
<i>Characidium timbuiense</i>	LBP 18475	69812	Córrego Valsugana Velha	Santa Teresa, Espírito Santo	Brasil	KM229365
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78144	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78138	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78169	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78130	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78161	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-

<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78141	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78140	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78139	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78128	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78127	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78171	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78170	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78168	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78164	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-	78137	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	-
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	-		Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	Scacchetti 2015
<i>Characidium vidali</i>	-	78142	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	
<i>Characidium vidali</i>	-	78126	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	
<i>Characidium vidali</i>	-	78167	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	
<i>Characidium vidali</i>	-	78143	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	
<i>Characidium vidali</i>	-	69839	Rio São João	Silva Jardim, Rio de Janeiro	Brasil	KM2293671

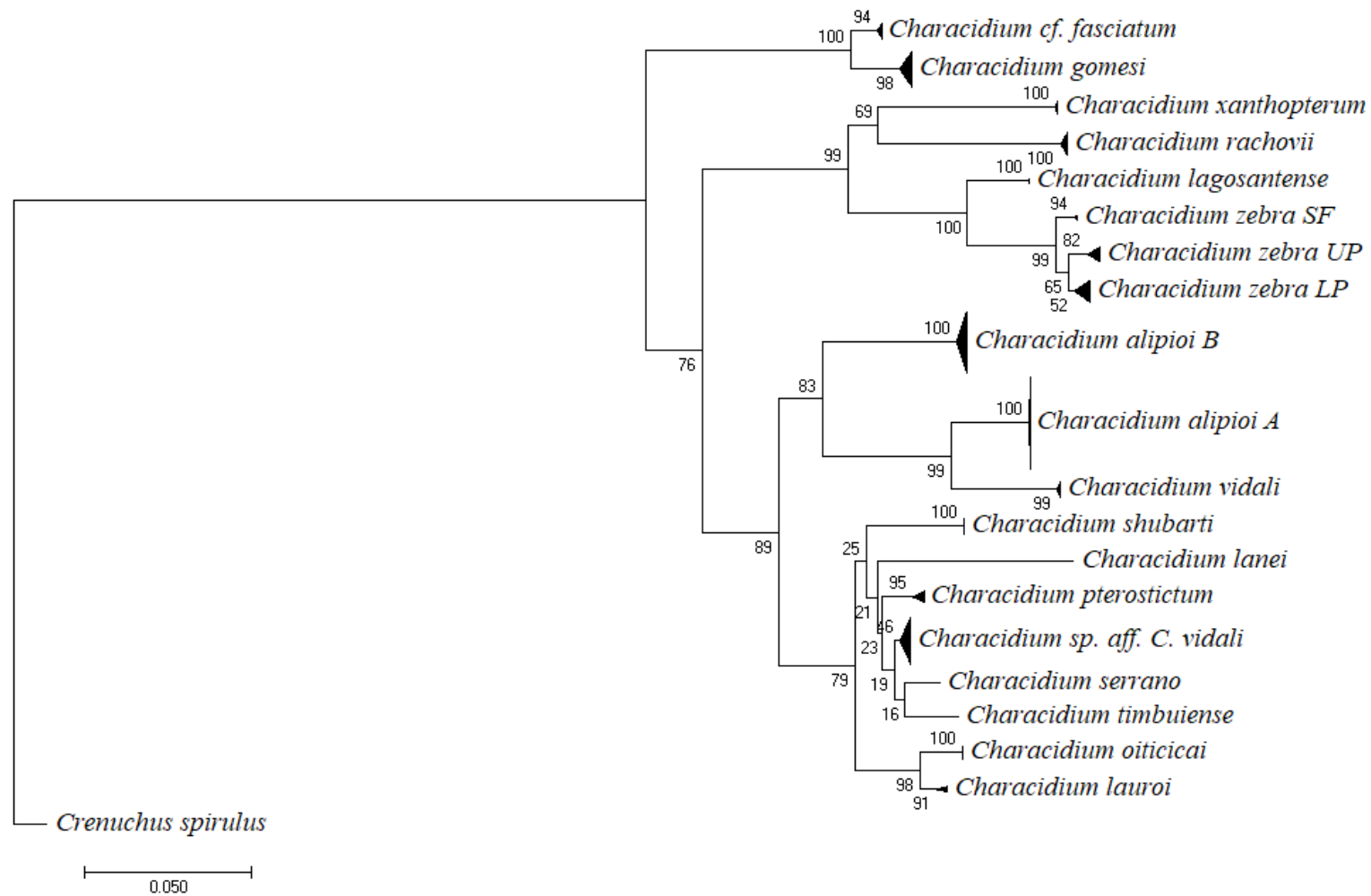


Figura Anexo 2. Árvore de neighbor-joining obtida de uma matriz do gene mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I* de espécies de *Characidium*. Números próximos aos nós representam valores de bootstrap. SF = Rio São Francisco, UP = Upper Rio Paraná, LP = Lower Rio Paraná.

3.3 Capítulo 3

Sequenciamento massivo e busca de DNAs satélites em cromossomos B de *Characidium sp. aff. C. vidali*

Introdução

Os cromossomos B são elementos extras ao complemento padrão A, e desde a sua descoberta no início do século XX (Wilson 1907), já foram reportados nos genomas de animais, plantas e até mesmo em fungos. Estes cromossomos são também chamados de supranumerários; na maioria dos casos não seguem as leis de herança mendeliana e não se recombina com os cromossomos do complemento A (Camacho 2005). Por não conferirem vantagens ao genoma hospedeiro, ficaram conhecidos como parasitas genéticos (Camacho 2005).

Muitas investigações já foram feitas para compreender como estes supranumerários se originam no genoma hospedeiro, e a partir disso como evoluem e se há compartilhamento de sequências com os cromossomos A (Camacho et al. 2005; Bugrov et al. 2007; Valente et al. 2016). Em relação à sua origem, já é considerado que os supranumerários podem derivar do próprio complemento padrão A, que é conhecida como origem intraespecífica, já reportada em milho (Lamb et al. 2005; Peng & Cheng 2011), centeio (Martins et al. 2012), gafanhoto (Teruel et al. 2010), e alguns peixes (Silva et al. 2014; Pansonato-Alves et al. 2014; Utsunomia et al. 2016; Serrano et al. 2017). Um segundo caso seria em decorrência de hibridizações, conhecida como origem interespecífica, onde o surgimento dos cromossomos B pode ser particular em cada espécie (Sapre & Deshpande 1987; McAllister & Werren 1997; Perfectti & Werren 2001; Schartl et al. 1995 Pansonato-Alves et al. 2014).

Com os avanços tecnológicos, e a citogenética caminhando em conjunto com a genômica estrutural/funcional, estudos estão cada vez mais desvendando mecanismos moleculares relacionados à rearranjos cromossômicos durante a evolução dos genomas (Valente et al. 2016). O Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing - NGS) proporcionou análises em larga escala, com o intuito de investigar o conteúdo dos cromossomos B presentes em diferentes organismos, mostrando que em alguns casos, os supranumerários podem apresentar genes repetitivos ou sequências de cópia única (Valente et al. 2016; Houben et al. 2014; Makunin et al. 2014). Em peixes, sequências de DNA satélites, genes ribossomais, elementos transponíveis e até mesmo sequências de histonas já foram observados nos cromossomos B de diferentes grupos (Paus & Bertolo

1983; Mestriner et al. 2000; Artoni et al. 2006; Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011; Ziegler et al. 2003; Hashimoto et al. 2012; Silva et al. 2014; Utsunomia et al. 2016).

Dentro do gênero *Characidium* ainda é reduzido o número de espécies descritas com genomas portadores de cromossomos B (Miyazawa e Galetti Jr. 1994; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015b; Serrano et al. 2017). Alguns autores, utilizando a técnica de pintura cromossômica já conseguiram elucidar informações quanto a presença de supranumerários em alguns cariótipos, como por exemplo em *Characidium gomesi*, *C. pterostictum* e *C. alipioi*, onde os cromossomos B possivelmente se originaram de forma intraespecífica (Pansonato-Alves et al. 2014; Serrano et al. 2017). Porém, apenas em *Characidium oiticicai* foi proposto que os supranumerários teriam surgido por mecanismos que incluem eventos de associações interespecíficas (Pansonato-Alves et al. 2014). Como já mencionado anteriormente, análises *in silico* para caracterizar sequências repetitivas presentes em cromossomos B têm sido muito utilizadas nos últimos anos. Porém, em espécies pertencentes à *Characidium* podemos citar apenas as investigações realizadas em *C. gomesi*, que após sequenciamento massivo e mapeamento físico (FISH) apresentou sequências de DNAs satélites e histona em seus cromossomos B (Serrano 2016).

Characidium sp. aff. *C. vidali* é uma espécie ainda não descrita do gênero, que já foi reportada distribuída nos rios Macaé, São João e Paraíba do Sul (Leitão & Buckup et al. 2014). As primeiras informações citogenéticas da espécie foram descritas por Scacchetti et al. (2015), que analisaram uma população de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* ocorrendo em simpatria com *Characidium vidali*. Embora as duas espécies compartilhem a macroestrutura e o número diploide comum ao gênero ($2n = 50$ cromossomos), apenas em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* são observados cromossomos B; morfologicamente semelhantes a pequenos acrocêntricos (Scacchetti et al. 2015; Capítulo 1). Estes supranumerários são facilmente identificados por bandamento C, devido ao grande acúmulo de heterocromatina constitutiva, e embora sejam mitoticamente instáveis, estão presentes em todas as células de todos os espécimes de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Scacchetti et al. 2015; Capítulo 1). Análises realizadas com o mapeamento físico de sequências repetitivas, mostram motivos de quatro microssatélites acumulados nos cromossomos B desta espécie (Capítulo 1), e de acordo com investigações abordadas no Capítulo 2, os supranumerários de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* se originaram de forma intraespecífica.

O presente trabalho teve como objetivo obter sequências de DNAs satélites no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e a partir disso estabelecer relações entre estes repetitivos e os cromossomos B presentes no cariótipo da espécie. Adicionalmente, os dados amostrados ao final também poderão agregar informações sobre os supranumerários terem se originado de forma intraespecífica nessa população de peixes. Para isto, foram utilizadas técnicas como hibridação *in situ* fluorescente (FISH), reação em cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento massivo pela plataforma Illumina, seguida de análises bioinformáticas.

Material e Métodos

Sequenciamento do genoma total dos espécimes e identificação de DNAs satélites

Foi sequenciado o DNA genômico de três fêmeas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, todas portadoras de cromossomos B. Foram contadas 20 metáfases por espécime, e como os supranumerários (embora mitoticamente instáveis) estiveram presentes em todas as células de todos os exemplares da população, foi estabelecida uma quantidade média de cromossomos B (por célula) para cada uma das três fêmeas, como representado na Tabela 1. Foram escolhidos exemplares fêmeas por serem heteromórficas (ZZ/ZW), o que significa a representação do genoma completo da espécie. O sequenciamento do gDNA foi realizado na plataforma illumina HiSeq2500, produzindo leituras *paired-end*.

Tabela 1: Identificação das três fêmeas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* utilizadas para sequenciamento massivo (NGS), e número médio de cromossomos B observados por célula em cada indivíduo.

Identificação dos indivíduos fêmeas	78127	78128	78161
Número médio de cromossomos B	2 a 3	3 a 4	1 a 2

Como os três genomas sequenciados eram portadores de cromossomos B, foi proposto juntar as três bibliotecas para a busca das sequências de DNAs satélites. Então, primeiramente foi realizado um teste com o intuito de se estabelecer uma longitude mínima (determinar um número mínimo de nucleotídeos para os *reads*). Foram testados os tamanhos de 100, 150 e 200 nucleotídeos, com qualidade de 20 ($Q > 20$) e número de leituras estipulado em 10. Essa primeira análise foi realizada para cada biblioteca (contendo os dois arquivos). Em seguida, utilizamos o *script*: `fastx_trimmer`

(https://github.com/fjruiuzruano/ngs-protocols/blob/master/mapping_blat_gs.py) que realizou cortes nos arquivos 1 e 2 de cada biblioteca, estipulando o número de nucleotídeos de cada um. A contagem dos nucleotídeos (em cada arquivo), foi realizada com o script: `cout_bases_fastq.py` (https://github.com/fjruiuzruano/ngs-protocols/blob/master/mapping_blat_gs.py). Ao final, os valores obtidos para os arquivos 1 e 2 (de cada biblioteca) foram somados, e estão representados na Tabela 2. Os testes realizados com o valor de corte de 150 nucleotídeos foi o que não apresentou diferenças consideráveis entre as três bibliotecas, por isso este valor foi estabelecido como longitude mínima a ser utilizado nas análises do RepeatExplorer.

Tabela 2: Valores finais das somatórias dos pares de base de cada biblioteca, com três diferentes cortes (longitude mínima) de 200, 150 e 100. Em destaque o valor de corte escolhido.

Identificação dos indivíduos fêmeas			
nº de nucleotídeos	78127	78128	78161
200	295.918.400	486.055.511	1.039.923.600
150	1.343.164.500	1.085.997.900	1.247.461.200
100	935.266.600	748.523.200	878.086.800

Então, os dois arquivos de cada biblioteca foram preparados para o RepeatExplorer (Novák et al. 2013), com o *script* `rexp_prepare_normaltag.py` (https://github.com/fjruiuzruano/ngsprotocols/blob/master/mapping_blat_gs.py), utilizando 20 de qualidade ($Q > 20$) e a longitude mínima selecionada (150).

Como todos os indivíduos apresentaram cromossomos B em seus genomas, os arquivos 1 das três bibliotecas, assim como os arquivos 2 foram concatenados. As leituras foram agrupadas e amostradas em 2 x 100.000 leituras, com corte de qualidade através do Trimomatic (Bolger et al. 2014). Em seguida, foi realizada a análise com o RepeatExplorer (Novák et al. 2013). Os clusters que apresentaram estrutura característica de satDNA (forma de anel ou esféricos) foram selecionados e os monômeros extraídos no Geneious v4.8.5. Isso permitiu a detecção de 12 satDNAs, e para obter um maior número de satDNAs, foi utilizado o protocolo satMiner, descrito por Ruiz-Ruano et al. (2016). Para isto, foram realizadas quatro rodadas do protocolo duplicando-se o número de leituras a cada rodada (2 x 200.000, 2 x 400.000, 2 x 800.000 leituras), até não ser possível se obter mais clusters semelhantes a satDNAs.

Os monômeros foram também investigados quanto a homologia entre eles, e agrupados quando a identidade entre eles foi maior que 95%. Quando este valor esteve entre 95% e 80%, os monômeros foram agrupados com representantes de uma mesma família, e quando os valores foram observados entre 50% e 80% foram classificados como uma mesma superfamília.

Para cada família, foi calculada a abundância e divergência através do RepeatMasker (Smit et al. 2013), através do mecanismo de busca cross_match. Para cada família satDNA foi atribuído um nome seguindo os critérios propostos por seguindo Ruiz-Ruano et al. (2016).

Após serem obtidos por análises de bioinformática, todos os satDNAs foram amplificados por PCR inversa utilizando *primers* desenhados com orientação oposta. Foi utilizada a seguinte reação: 2,5µl 10x PCR Buffer, 2,0µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl dNTP mix, 0,5µl de cada primer (10mM), 1,0µl de DNA da espécie, 0,2µl de Taq polimerase PHT e 16,8µl de H₂O destilada, com um volume final de 24µl. O programa utilizado para essa reação foi de 2 min à 95°C (denaturação inicial), 15s à 95°C (denaturação), 10s à 54°C (anelamento), 15s à 68°C (extensão), e 12min à 68°C (extensão final). As sequências de cada primer desenhado estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3: Primers desenhados para amplificação de cada satDNA.

Família Satélites	Forward	Reverse
CavSat01	GCCTAAACGCTTTCTAACGC	CGCCTCTACAGTGCAGA
CavSat02	CGCAGCCAGTTGTGAGTTTTATC	GCCTGGTTAGTACTTGGATGGGA
CavSat03	GCGTTCAGCATTATGTGTGCATT	GCCACTTGATTGTACCAGTAGCA
CavSat04	GGCTCATCCTGATTATAAAGGACT	GCCACCAGCAGCTTGTAG
CavSat05	CGGGCTTCTGCAGTAATGG	CGCTGGTTCAAATCCGGCTC
CavSat06	GGGGGACCTTACAAACTACTTTAGC	GGCGCTTGCTATTATCTCCTAAGG
CavSat07	CCCACTGCTGCCAATGGAAGTTTTTC	CCGAAGAGACTGGAGCCTTAATCCA
CavSat08	GCCCCCTGTTGAGGAGGTAC	GGCACCCGGATTTGAACCAG
CavSat09	CGGATTGACCTCATAGGCTACGATA	CGCCCGGATGACTTGAAATATAGTC
CavSat10	CCGAATGGAGGCGTGGGTTCAAATC	CGGAGACCAGAATCCTCAACACAGT
CavSat11	GGGAGCCTTGTAAGGCTC	GCGTTTGCAGCTCTTTAGAAG
CavSat12	CGCTTCCAGTATCAATACTTTAGGT	CGCATTCTGAAAAGGTAATATAATCT
CavSat13	GGGAACTGAGATTCATGAAGAAGTGC	CGCAGTGACAGACCTCAAAAAGTATG
CavSat14	GGGGTCATTTACCAAGCGTTTCAC	CCCAAGTGGTGTACCAGGTGAAAGA
CavSat15	CCCAAAAGCTTTATAACACTGTCAC	GCCTTGACTATGCCTTTTGAGCTT

Marcação das sondas de satDNA

Após a amplificação, cada reação foi verificada em gel de agarose 1,5%, e dos 15 conjuntos de *primers* analisados, apenas 9 apresentaram o padrão de escada (característico de DNA satélite). Estes nove *primers* então foram selecionados para as reações de marcação das sondas. As reações foram montadas para um volume final de 25 μ l, utilizando: 2,5 μ l 10x PCR Buffer, 2,0 μ l MgCl₂ (50mM), 0,5 μ l de dATP, dCTP, dGTP e 0,35 μ l de dTTP, 0,5 μ l de cada primer (10mM), 1,0 μ l de DNA da espécie, 0,2 μ l de Taq polimerase PHT e 16 μ l de H₂O destilada. Todas as sondas foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP. O programa seguido foi o mesmo utilizado para as amplificações iniciais.

Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Para o mapeamento físico das sequências de DNAs satélites foi utilizado o protocolo de Pinkel et al. (1986), com adaptações. Todas as lâminas foram coradas com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif, USA), analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens obtidas a partir do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Md.USA). As composições finais das imagens foram realizadas com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6.

Resultados

Todas as células, de todos os exemplares de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* apresentaram cromossomos B, embora mitoticamente instáveis. Um número médio de cromossomos B por célula foi anotado para cada uma, como representado na Tabela 1.

O sequenciamento massivo realizado a partir do DNA genômico das três fêmeas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* gerou três bibliotecas, que após análises prévias de bioinformática, foram agrupadas e analisadas como uma única biblioteca. Na primeira rodada e filtragem do RepeatExplorer foram obtidos 12 diferentes DNAs satélites. Em cada análise subsequente, os satélites já encontrados passavam a ser incorporados a uma base de dados, utilizada nas próximas filtrações, e assim, satélites que já haviam sido analisados, não foram considerados novamente. Na segunda, terceira e quarta rodadas seguidas de filtragem (RepeatExplorer), apenas um satélite foi obtido em cada. Ao final então, um total de 15 sequências de DNAs satélites foram obtidas e todos foram utilizados para o desenho dos *primers* (Tabela 3).

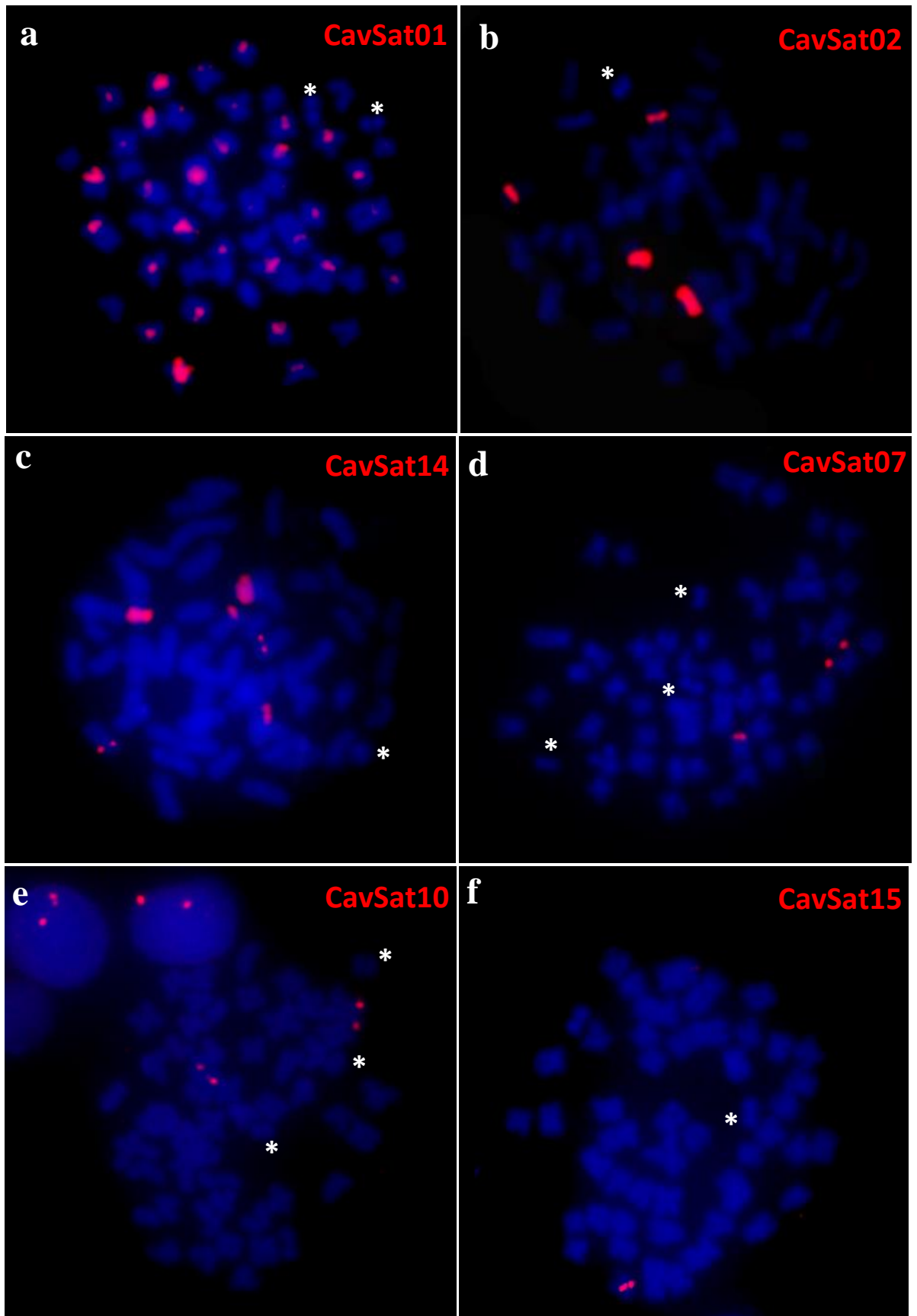


Figura 1: Cromossomos metafásicos de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* após Hibridação *in situ* Fluorescente com diferentes sondas de DNA satélites. Os asteriscos destacam os cromossomos B.

De acordo com os dados obtidos por mapeamento físico, apenas seis sondas de DNAs satélites mostraram resultados satisfatórios após as hibridações, porém, nenhuma delas apresentou marcações nos cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Figura 1). O DNA satélite CavSat01 marcou a região centromérica da maioria dos cromossomos da espécie, porém, nenhum sítio marcado foi observado nos supranumerários (Figura 1a). Já o DNA satélite CavSat02 foi observado no braço curto e no braço longo de pares submetacêntricos distintos (Figura 1b). Clusters de DNAsat CavSat14 marcaram o braço curto de dois pares submetacêntricos, e o braço longo de um par submetacêntrico (Figura 1c). A sequência de CavSat07 foi observada no braço longo de um par metacêntrico médio (Figura 1d), enquanto CavSat10 marcou o braço longo de um par submetacêntrico (Figura 1e). Por fim, o CavSat15 foi observado clusterizado na porção pericentromérica de um pequeno metacêntrico, sendo identificado apenas em um dos homólogos (Figura 1f).

Discussão

Como no presente trabalho todos os espécimes apresentaram cromossomos B em suas células, foi necessário o sequenciamento massivo do genoma de três fêmeas de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, e unir as três bibliotecas geradas para o desenvolvimento das metodologias para proporcionar uma análise mais robusta quanto a busca por DNAs satélites.

Os resultados obtidos com o mapeamento físico das sondas de DNAs satélites mostram que, nenhuma das seis sequências apresentam homologia com os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Porém, vale ressaltar que o satélite CavSat01 apresentou um acúmulo preferencial pela região pericentromérica da maioria dos cromossomos do complemento A, e como já foi apontado em outros estudos, essa região também é marcada por heterocromatina constitutiva (Scacchetti et al. 2015; Capítulo 1), o que indica que as sequências repetitivas acumuladas nos supranumerários (totalmente heterocromáticos), não corresponde a repetições de CavSat01. Os demais satélites parecem ter se espalhado por um número menor de cromossomos dentro do cariótipo de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*.

O padrão observado para o CavSat01 se assemelha ao padrão encontrado para os satélites ApaSat02-236 e ApaSat04-233 em *A. paranae*. Nesta espécie, estes dois DNAs satélites estão entre os mais abundantes e podem desempenhar um papel na função centromérica (Silva et al. 2017). Usualmente é assumido que o satélite mais abundante em uma espécie desempenha a função centromérica (Melters et al. 2013). Entretanto, em algumas espécies foi observado que os DNAs satélites localizados nesta região podem ocupar outras posições na ordem de abundância, como em *E. monticola*, onde o satélite encontrado na região pericentromérica ocupa a oitava posição nesta escala (Ruiz-Ruano et al. 2016) e em *A. paranae*, onde os dois satélites citados ocupam a segunda e quarta posições (Silva et al. 2017). Em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, o CavSat01 é o mais abundante na escala e mostra um acúmulo na região pericentromérica dos cromossomos. Assim, é possível propor que este DNAsat pode estar envolvido na função centromérica.

O CavSat15 foi observado somente em um cromossomo em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, indicando que este DNA satélite está em fase inicial de clusterização no genoma da espécie. Os demais DNAs satélites foram observados em pares de cromossomos homólogos mostrando que em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* os mecanismos de disseminação deste tipo de sequência no genoma estão com atuação reduzida. Além disso, parece que o estágio de amplificação e clusterização destas sequências envolve uma alta taxa de recombinação entre os cromossomos homólogos.

Quando se fala em cromossomos B, é instantâneo o reforço da ideia sobre elementos extras ao genoma padrão, ou ainda dispensáveis ao DNA hospedeiro. Tais informações são substanciais quando se tem em uma mesma população indivíduos portadores e não portadores de supranumerários, induzindo a curiosidade para se investigar o impacto dessas características no genótipo e/ou no fenótipo do organismo. No presente estudo, foi analisada uma população de peixes onde todos os indivíduos apresentaram células portadoras de cromossomos B, o que nos leva a pensar que, talvez para *Characidium* sp. aff. *C. vidali* os supranumerários sejam elementos importantes na composição do seu genoma.

Embora mitoticamente instáveis (com variação de 1 a 4 por célula), os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* compartilham da mesma morfologia, são totalmente heterocromáticos, e possuem sequências de quatro microssatélites acumulados em seu DNA (Capítulo 1), indicando que a espécie é portadora de apenas um tipo de supranumerário. Além disso, também foram observadas sequências teloméricas marcadas nas porções terminais destes supranumerários (Capítulo 1), e como é sabido,

tais sítios conferem estabilidade estrutural aos cromossomos (Meyne et al. 1990; Guerra et al. 2004), sendo então mais um indício de que estes cromossomos já estão bem estabelecidos nessa população de *Characidium*.

Em *Characidium*, poucas espécies apresentam cromossomos B (Miyazawa e Galetti Jr. 1994; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015b; Serrano et al. 2017), e de acordo com Pansonato-Alves et al. (2014), a origem destes supranumerários tem ocorrido de maneira independente dentro do gênero. Até o momento, o único trabalho envolvendo sequenciamento massivo para explorar o conteúdo de cromossomos B em espécies de *Characidium* foi apresentada por Serrano (2016), que investigando DNAs satélites conseguiu propor que as duas variantes presentes em *C. gomesi* tiveram origem a partir de um ancestral comum, e que provavelmente os cromossomos sexuais foram os precursores dos supranumerários.

Embora as análises realizadas no presente estudo não tenham apresentado respostas diretas quanto a origem dos cromossomos B em *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, o aprofundamento no conhecimento do satelitoma desta espécie agrega informações a respeito do conhecimento dos DNAs satélites em geral.

4. Considerações finais

O mapeamento físico de diversas sequências repetitivas no genoma de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* foi de extrema importância para conhecer sobre a estruturação cromossômica dessa população de peixes, e com isso agregar conhecimento sobre a evolução cariotípica do gênero.

As sondas investigadas no genoma da espécie, quando comparadas com dados já reportados em literatura, nos leva a propor que do ponto de vista microestrutural, os cariótipos dos peixes pertencentes à *Characidium* têm sofrido constantes modificações, por esses peixes habitualmente formarem grupos pequenos, onde facilmente modificações cariotípicas podem acabar se fixando na população.

Há evidências de que o genoma da espécie faça uso de mecanismos de reparo para evitar possíveis quebras que modifiquem estruturalmente seus cromossomos, e por consequência altere o número diploide e morfologia cromossômica, já considerados homogêneos para o grupo. Para suportar nossa hipótese, ressaltamos aqui a existência de sítios teloméricos intesticias (ITS), e os double-ITS em um pequeno grupo suportado filogeneticamente como monofilético e com resultados citomoleculares bastante particulares.

Characidium sp. aff. *C. vidali* ocorre em condição simpátrica com *Characidium vidali*, e corroborando a literatura, apenas a primeira espécie seria portadora de cromossomos B. Para reforçar e dar maior confiabilidade à essa distinção de espécies, apresentamos pela primeira vez os resultados de topologias que confirmam a distância entre elas.

Propusemos que os cromossomos B de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* tiveram origem intraespecífica, e a ausência de marcações após a pintura cromossômica com a sonda CypB evidencia que ao longo da evolução do genoma portador, estes supranumerários sofreram modificações em relação ao seu conteúdo genômico.

Quando observados o padrão de distribuição de sequências teloméricas, assim como as marcações de quatro microssatélites, *Characidium* sp. aff. *C. vidali* mostrou informações

bastante semelhantes à outras três espécies do gênero, pois os mesmos motivos acumulados nos supranumerários da nossa espécie, já haviam sido descritos nos pares acrocêntricos de *C. serrano*, *C. pterostictum* e *C. timbuiense*. Adicionalmente, duas topologias obtidas no presente estudo mostraram que geneticamente e filogeneticamente as quatro espécies de *Characidium* são próximas, constituindo um grupo monofilético. Sendo assim, nossa proposta é que em um genoma ancestral ao clado que reúne as quatro espécies, um cromossomo submetacêntrico tenha passado por inversões pericêntricas, que em *C. serrano*, *C. pterostictum* e *C. timbuiense* deram origem ao par acrocêntrico, porém, em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* este cromossomo pode ter sofrido uma quebra horizontal na região do centrômero, e originado dois cromossomos metacêntricos de menor tamanho (hipótese do isocromossomo). Ao longo da evolução cariotípica desta população, estes cromossomos sofreram modificações morfológicas e genotípicas, e originaram os cromossomos B da espécie.

Nossos resultados agregam informações para que futuramente mais estudos citomoleculares sejam realizados em conjunto com ferramentas filogenéticas, relacionando cada vez mais a organização genômica e os processos de distribuição das espécies e/ou populações de *Characidium*.

5. Referências

- Abuín M, Martínez P, Sánchez L. Localization of the telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. *Genome*. 1996; v. 39, p. 1035-1038.
- Alfenito MR, Birchler JA. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 1993; v. 135, 2 p.589-597.
- Araya-Jaime C, Lam N, Pinto IV, Méndez MA and Iturra P. Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotansensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Comparative Cytogenetics*. 2017; 11:463–475. doi: 10.3897/compcytogen.v11i3.11729
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, de Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LA. Banding pattern of A and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetica*. 2006; 127: 277–284. doi:10.1007/s10709-005-4846-1
- Ashley T, Ward DC. A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster, *Cytogenet*. 1993; *Cell Genet*. 62 169–171.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Bertollo LAC, Traldi JB, Moreira-Filho O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2013; 23(1): 127-134.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira Filho O. Origin of the X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*. 2014; 142, 119–126. DOI 10.1007/s10709-014-9759-4.

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bolzán AD, Bianchi MS: Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 2006; 612: 189–214.
- Buckup PA. Family Crenuchidae. In R. E. Reis, S. O. Kullander, & C. J. 405 Ferraris Jr (Eds.), (pp. 87-95). Porto Alegre: Edipucrs 2003.
- Buckup PA. The Eastern Brazilian Shield. In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.) (pp. 203-210). Berkeley and Los Angeles: University of California Press 2011.
- Buckup PA, Van der Sleen P. Family Crenuchidae. In P. Van der Sleen & J. S. Albert (Eds.), (pp. 142-148). Princeton: Princeton University Press 2017.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN, Warchalowska-Sliwa E, Tatsuta H, Runtsov NB. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research.* 2007; 15: 315-326.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 2000; 355: 163-178.
- Camacho JPM. B chromosomes. In *The Evolution of the Genome* (ed. Gregory, T. R.) 223–286 (Academic Press, 2005).
- Caramaschi, E. Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tiete e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Doctoral Thesis. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos 1986.
- Cavalier-Smith, T. Selfish DNA and the origin of introns. (1985). *Nature*, V. 315, N. 6017, P. 283–284, 23 maio 1985. disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/315283b0>>.

- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). – *Caryologia*. 2002; 55: 139–150.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*. 2001; 54(3), 253-260. doi:10.1080/00087114.2001.10589233.
- Centofante L, Bertollo LA, Buckup PA, Moreira-Filho O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*. 2003; 138(3), 213-218. doi: 10.1034/j.1601- 5223.2003.01714.x.
- Chan SS, Chang S. Defending the end zone: studying the players involved in protecting chromosome ends. *FEBS letters*. 2010; 584(17): 3773-3778.
- Charlesworth B, Snlegowski P and Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 1994; 371:215-220.
- Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ: Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG) n repetitive sequences in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*. 2002; 111: 45–52.
- Childs G, Maxson R, Cohn RH and Kedes L. Orphans: Dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. *Cell*. 1981; 23:651-663.
- Cioffi MB, Bertollo LAC. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X 1 X 2 Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity (Edinb)* 2010; 105: 554–561.
- Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC: The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 2011; 132: 289–296.

- Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. In: Garrido R, editor. Repetitive DNAs Genome Dynamics. Basel: Karger. 2012; pp. 197–221. doi: 10.1159/000337950 PMID: 22759820.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC, Grimwood J, Schmutz J, Taga M, White GJ, Zhou S, Schwartz DC, Freitag M, Ma Lj, VanEtten HD. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. PLoS Genet. 2009; 5:e1000618
- Colgan DJ, McLauchlan A and Wilson GDF. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Aust J Zool. 1998; 46:419-437.
- Covert SF. Supernumerary chromosome in filamentous fungi. Curr. Genet. 1998; 33:311-319.
- Cuadrado A, Jouve N. The nonrandom distribution of long cluster of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. Chromosom Res. 2007; 15:711–720. doi:10.1007/s10577-007-1156-8
- Cuadrado A, Jouve N. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. BMC Genomics. 2011; 12:205. doi:10.1186/1471-2164-12-205.
- Datta U, Dutta P, Mandal K. Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. Gene. 1988; v. 62, p. 331-336.
- Devlin RH, McNeil BK, Donaldson EM. Isolation of a Y-Chromosomal DNA Probe Capable of Determining Genetic Sex in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1991; v. 48, p. 1606-1612.
- Dimitri P, Arca B, Berghella L, Mei E. High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94: 8052–7. PMID: 9223313.

- Doolittle WF, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 1980; 284: 601–603.
- Dover GA: Evolution of genetics redundancy for advanced player. *Curr Opin Genet Dev*. 1993; 3: 902–910.
- Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. (2004); 5(1), 113-113. doi:10.1186/1471-2105-5-113
- Eirín-López J.M., González-Romero R., Dryhurst D., Méndez J., Ausió J. Long-Term Evolution of Histone Families: Old Notions and New Insights into Their Mechanisms of Diversification Across Eukaryotes. In: Pontarotti P. (eds) *Evolutionary Biology*. Springer; 2009, Berlin, Heidelberg.
- Fantinatti BE, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica*. 2011; 139: 273–282.
- Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS letters*. 2010; 584(17): 3812-3818.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*. 1993; 49, 810-813.
- Garrido- Ramos MA, de la Herran R, Ruiz- Rejon M, Ruiz- Rejon C. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet*. 1998; 83:3– 9.
- Garrido-Ramos MA. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenet. Genome Res*. 2015; 146, 153–170. doi: 10.1159/000437008.

Graphodatsky A S. et al. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res.* 2005; 13, 113–122.

Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman K, Leitch IJ, Murray, BG, Kapraun DF, Greilhuber J, Bennett MD. Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Database, p. D332–D338, 3 jan. 2007. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkl828>.

Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Research.* 2004; 12: 143-151.

Guerra, M. 2004. FISH: conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP, BR. 184pp.

Hancock JM: Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays.* 1986; 18: 421–425.

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F: Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 2011; 134: 64–71.

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F and Porto-Foresti F. Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogen Genome Res.* 2013; 139:102-106.

Hastie ND, Allshire RC. Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends in Genetics.* 1989; 5: 326-331.

Holmquist GP Dancis B. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1979; 76(9): 4566-4570.

- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71: 467-478.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:4780.
- Jesus CM, Galetti PM Jr, Valentini SR, Moreira-Filho O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*. 2003; 118, 25–32. doi: 10.1023/A:1022986816648.
- Kearse M., et al. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. 2012. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Kedes LH. Histone genes and histone messengers. *Annu Rev Biochem*. 1979; 48:837-870.
- Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*. 2002; p. 49–63.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*. 2008; 51: 350–356. <https://doi.org/10.1139/G08-024>.
- Lamb JC, Riddle NC, Cheng YM, Theuri J, Birchler JA. Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosom Res*. 2007; 15:383–398.
- de Lange T . Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*. 2005; 19(18): 2100-2110.

- Leach CR, Houben A, Bruce F, Pistrick K, Demidov D, et al. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*. 2005; 171: 269–278.
- Leitão RP, Buckup PA. New Species of Characidium (Characiformes: Crenuchidae) from Coastal Basins of Serra do Mar, Southeastern Brazil. *Copeia*. 2014; 2014: 14–22. doi: 10.1643/CI-12-137.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52: 201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.
- Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4:203–221.
- Lim JK, Simmons MJ. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*. 1994; 16:269–75. PMID: 8031304
- Lin WK, Yan J. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res*. 2008; 658:95–110.
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA: Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1993; 134: 1149–1174.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content in eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Repetitive DNA genome dynamics v 7*. Karger, Basel. 2012; pp 1–28.
- López-León M, Cabrero J, Pardo M, Viseras E, Camacho JPM, Santos J. Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). *Heredity*. 1993; 71: 352-352.
- Luke B, Lingner J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO journal*. 2009; 28(17): 2503-2510.

- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Artoni RF. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics*. 2011; 12 (1), 65. Doi: 10.1186/1471-2156-12-65
- Maistro EL, Prieto-Mata E, Oliveira C, Foresti F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*. 1998; 104, 1–7.
- Maistro EL, de Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F. Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia*. 2004; 69(2), 181-186. doi: 10.1508/cytologia.69.181.
- Makunin AI. et al. Genes on B chromosomes of vertebrates. *Mol. Cytogenet*. 2014; 10.1186/s13039-014-0099-y.
- Makunin, A. I. et al. Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. *BMC Genomics*. 2016; 10.1186/s12864-016-2933-6.
- Martins C, Galetti PM Jr. Chromosome localization of 5S rRNA genes in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*. 1999; 7:363–367.
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Nat Ac Sci*. 2012; USA 109:13343–13346
- McAllister BF, Werren JH. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*. 1997; 106(4):243–53. PMID: 9254726
- McMurray CT: Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma*. 1995; 104: 2–13.

- Melters DP, Melters DP, Bradnam KR, Young HA, Telis N, May MR, Ruby JG, Sebra R, Peluso P, Eid J, Rank D, Garcia JF, DeRisi JL, Smith T, Tobias C, Ross-Ibarra J, Korf I, Chan SW. Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biol.* 2013; 14, R10.
- Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini SR, Ruiz IR, Abel LD, Moreira-Filho O, et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity.* 2000; 85, 1–9. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00702.x
- Metcalf CJ, Eldridge MD, Johnston PG. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the 2n= 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research.* 2004; 12(4): 405-414.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservative of the human telomere sequences (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 86:7049–7053.
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. *Science.* 1991; 254: 1773-1776.
- Miyazawa CS, Galetti-Jr PM. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Cytologia.* 1994; 59:73-79.
- Monaco PJ, Swan KF, Rasch EM, Musich PR. Characterization of a repetitive DNA in the unisexual fish *Poecilia Formosa*. I . Isolation and cloning of the MboI family. *Evol. Ecol. Unisex Vertebrates.* 1989; v. 466, p. 123-131.
- Moyer SP, MA DP, Thomas TL, Gold JR. Characterization of a highly repeated satellite DNA from the cyprinidae fish *Notropis lutrensis*. *Comp Biochem Physiol.* 1988; v. 91B, p. 639-646.

- Mühlmann-Diaz MC, Ulsh BA, Whicker FW, Hinton TG, Congdon JD, Robinson JF, Bedford. Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2001; 92(1-2): 139-43.
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y and Matsuo Y. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: Coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Mol Biol*. 2005; 14:713-717.
- Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Scharl M, Chourrout D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*. 1994; 103:31–39.doi: 10.1007/BF00364723.
- Nanda I, Feichtinger W, Schimid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JT. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the gruppy fish. *J. Mol. Evol*. 2005; v. 30, p. 456-462.
- Navas-Castillo J, Cabrero J, Camacho JPM. Chiasma redistribution in bivalents carrying supernumerary chromosome segments in grasshoppers. *Heredity*. 1985; 55: 245-248
- Nergadze SG, Santagostino MA, Salzano A, Mondello C, Giulotto E. Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol*. 2007; 8:R260.
- Noletto RB, Amorim AP, Vicari M R, Artoni RF, Cestari MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*. 2009; 75(2), 448-453. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02342.x.
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. RepeatExplorer: a galaxy based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-

generation sequence reads. *Bioinformatics*. 2013; 29:792–793.doi:10.1093/bioinformatics/btt054

Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*. 2005; 39:121–152.

Ocalewicz K, Furgala-Selezniow G, Szmyt M, Lisboa R, Kucinski M, Lejk AM, Jankun M. Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. *Genetica*. 2013; 141:409–416

Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y. Intraspecific variation in the distribution of interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res*. 2000; 8:585–591

Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y. Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenet Genome Res*. 2003; 98:278–284

Palm W, de Lange T. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42: 301-334.

Pansonato-Alves, J. C., Paiva, L. R. S., Oliveira, C., & Foresti, F. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*. 2010; 8(1), 77-86. doi: 10.1590/S1679-62252010000100010.

Pansonato-Alves, J. C., Oliveira, C., & Foresti, F. Karyotypic conservatism in samples of *Characidium cf. zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology*. 2011a; 34(2), 208-213. doi: 10.1590/S1415-47572011005000005.

- Pansonato-Alves, J. C., Vicari, M. R., Oliveira, C., & Foresti, F. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*. 2011b; 78(1), 183-194. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02847.x.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C and Foresti F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae): Analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisher*. 2013; 23:477-489
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JP, Costa Silva GJ, Vicari MR, Foresti F. Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS ONE*. 2014; 544 9(9), e107169. doi:10.1371/journal.pone.0107169.
- Pathak D, Ali S. Repetitive DNA: A tool to explore animal genomes/ transcriptomes. In: Germana M, Petrera F (Eds) *Functional genomics*. InTech, Published. 2012; 155–180. doi: 10.5772/48259.
- Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME, Stamatakis A. How many bootstrap replicates are necessary? *Lecture Note in Computer Science*. 2009, 5541, 184–200. [https:// doi.org/10.1007/978-3-642-02008-7_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02008-7_13).
- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato- Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *Genetica*. 2013; 141:1–9.
- Peng SF, Cheng YM. Characterization of satellite CentC repeats from heterochromatic regions on the long arm of maize B-chromosome. *Chromosome Research*. 2011; 19(2):183–91. doi: 10.1007/ s10577-010-9183-2 PMID: 21246271
- Perfectti F, Werren JH. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*. 2001; 55(5):1069–73. PMID: 11430644

- Pineau P, Henry M, Suspène R, Marchio A, Dettai A, Debruyne R, Petit T, Lécu A, Moisson P, Dejean A, Wain-Hobson S, Vartanian JP. A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol.* 2005; 22: 582–588.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1986; 83: 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>.
- Piscor D, Parise-Maltempo PP. Microsatellite organization in the B chromosome and A chromosome complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species. *Cytogenet Genome Res* 2016;148:44–51.
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genet.* 2010; 11:1
- Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, et al: Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenet Genome.* 2013; Res 142: 40–45.
- Porto FE; de Rossi Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, de Brito Portela-Castro AL; Martins-Santos IC. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish.* 2014; 11(4): 318-324.
- Poveda-Martinez D, Sosa CC, Chacon-Vargas K, Garcia-Merchan VH. Historical biogeography of five *Characidium* fish species: Dispersal from the Amazon paleobasin to southeastern South America. *PLoS ONE.* 2006; 11(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164902>.
- Pucci MB, Barbosa O, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Moreira-Filho O, Vicari MR (2014) Population differentiation and speciation in

the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biol J Linn Soc.* 2014; 111:541–553

Pucci MB, Nogaroto V, Moreira-Filho O, Vicari MR. Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genetics and Molecular Biology.* 2018; 41, 3, 585-592. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0121>.

Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res.* 2008; 120: 351–357. doi: 10.1159/000121084 PMID: 18504364.

Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS ONE.* 2012; 7(5): e 36600.

Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research.* 2008; 122(3-4): 219-228.

Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado A, Montiel EE, Camacho JPM, Lopez-Leon MD. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma.* 2014; 124: 221–234.

Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* 2016; 6:28333. doi: 10.1038/srep28333

Sapre A, Deshpande D. Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity.* 1987; 78(3):191–6.

Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, da Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F. Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of

Characidium (Teleostei, Characiformes). *Genetica*. 2014; 143: 263–70. doi: 10.1007/s10709-014-9812-3 PMID: 25547849

Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium*: genomic organization and the diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 2015a; online first. doi: 10.1159/000437165.

Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Costa-Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Foresti F. Repetitive DNA sequences and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). *PloS ONE*. 2015b; 10(9), e0137231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137231>.

Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Tavares E ´ SGM, Martins C, Feldberg E. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). *Comp Cytogenet* 2015;9:595.

Serrano EA, Utsunomia R, Scudeller PS, Oliveira C, Foresti F. Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationships with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. *Comparative Cytogenetics*. 2017; 11(1), 81-95. doi:10.3897/CompCytogen.v11i1.10886.

Serrano EA, Melo BF, Freitas-Souza D, Oliveira MLM, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F. Species delimitation in Neotropical fishes of the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*. 2019; 48 (1), 69-80. <https://doi.org/10.1111/zsc.12318>

Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M, et al. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*. 1995; 373 (6509):68–71.

- Silva AR, Maistro EL. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado River, Minas Gerais, Brazil. *Genet Mol Biology*. 2006; 29:459–463
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F and Foresti F. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): Dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*. 2013; 141:329-336.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, 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*. 2014;9:e94896.
- Silva, DMZA.; Utsunomia, R.; Ruiz-Ruano, F. J.; Daniel, S. N.; Porto-Foresti, F.; Hashimoto, D. T.; Oliveira, C.; Camacho, J. P. M.; Foresti, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 12726.
- Smit AFA, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-4.0. 2013. <http://www.repeatmasker.org>
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*. 2008; 57, 758–771. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
- Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing Company, London, 287 pp.
- Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*. 1984; 25. 12(10): 4127–38. PMID: 6328411.

- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, et al: Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. *Sex Dev.* 2013; 7: 325–333.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research.* 2009; 17: 11-18.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma.* 2010; 119(2):217–25. doi: 10.1007/s00412-009-0251-3 PMID: 20016909
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI, Graphodatsky AS. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosome Research.* 2002; 10: 109-116.
- Trifonov VA. *et al.* Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biol.* 2013; 11, 90, 10.1186/1741-7007-11-90.
- Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. *Genetics and Molecular Biology.* 2014; 37: 30–36. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000100007>.
- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, et al. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLoS ONE.* 2016; 11:e0150573. doi: 10.1371/journal.pone.0150573.

- Utsunomia R, Melo S, Scacchetti PC, Oliveira C, Machado MA, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Foresti F. Particular Chromosomal Distribution of Microsatellites in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). ZEBRAFISH. 2018; doi: 10.1089/zeb.2018.1570.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA and Martins C. Cytogenetic Mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. Cytogenet Genome Res. 2011; 133:34-42.
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BE, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD, Martins C. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. Molecular Biology and Evolution. 2014; 31: 2061–2072.
- Valente GT, Nakajima RT, Fantinatti BEA, Marques BF, Almeida RO, Simões RP, Martins C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. Chromosoma. 2016; doi: 10.1007/s00412-016-0613-6
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). Genetica. 2008; 134(3), 311. doi: 10.1007/s10709-007-9238-2.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. Journal of Fish Biology. 2010; 76, 1094–1116. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x.
- Xia X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution. 2018; 35:1550–1552.
- Wagner RP, Maguire MP, Stallings RL. Chromosomes: A synthesis. Wiley-Liss Inc., New York pp. 523 1993.

- Ward RD, Zemiak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B*. 2005; 360:1847–1857.
- Wilson EB. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science*. 1907; 26:870–871.
- Yoshida, K. *et al.* B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLOS Genet*. 2011; **7**, e1002203, 10.1371/journal.pgen.1002203.
- Yoshida, K. *et al.* B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLOS Genet*. 2011; **7**, e1002203, 10.1371/journal.pgen.1002203.
- Zakian VA. 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, 270(5242): 1601.
- Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res*. 2014; 144: 325–332.