

Priscilla Cardim Scacchetti

**Estrutura Cromossômica e Caracterização Cariotípica no Gênero
Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae)**

Doutorado

Botucatu

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Estrutura Cromossômica e Caracterização Cariotípica no Gênero
***Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de
Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor.

Priscilla Cardim Scacchetti

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

Botucatu

2015

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

Scacchetti, Priscilla Cardim.

Estrutura cromossômica e caracterização cariotípica no gênero *Characi di um* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) / Priscilla Cardim Scacchetti. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: José Carlos Pansonato Alves

Capes: 20204000

1. Peixe - Pesquisa. 2. Peixe - Genética. 3. Citogenética.
4. Análise de DNA. 5. Cromossomos sexuais.

Palavras-chave: *Characi di um*; Citogenética; DNA repetitivo; cromossomo sexual; determinação sexual.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por minha família e meus amigos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e incentivo demonstrado em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho, muito OBRIGADA.

Ao meu coorientador Dr. José Carlos Pansonato Alves pela amizade, paciência, companheirismo e disponibilidade para todo o necessário para a realização deste trabalho.

A toda minha família, em especial meu pai Sérgio Scacchetti, meus irmãos Sérgio Scacchetti Filho, João Henrique Scacchetti e Daniela Cardim Scacchetti Bardagi e meus cunhados Marcos Patta Bardagi, Karen Utsunomia e Maria Clara Fontequ Scacchetti pela confiança e apoio incondicional em etapas importantíssimas da minha vida. Amo vocês.

Ao meu lindo e amado sobrinho Marcos Scacchetti Bardagi pelos fins de semana de muita alegria e descontração.

Ao professor Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador, incentivo e dedicação aos alunos.

Ao técnico Renato Devidé, pelo seu bom humor e por sempre estar disposto a ajudar.

A todos os meus amigos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes pelos momentos de descontração, disponibilidade, apoio e discussões. De alguma forma todos contribuíram para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

A Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu- SP) e ao Departamento de Morfologia que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Brasil. Agradeço esta instituição pelo apoio financeiro (Processo 2010/19971-8) e, principalmente pelo interesse neste estudo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser para uma pessoa: Meu noivo Ricardo Utsunomia. O meu mais profundo carinho e gratidão dedico a você pela paciência e amor incondicional dedicado, além de transmitir seus conhecimentos e experiências para a construção deste trabalho! Te amo!

Resumo

No presente estudo, foram analisadas dezoito espécies de peixes do gênero *Characidium*, *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante*, *C. stigmatosum*, *Characidium* sp1, *Characidium* sp2, *Characidium* sp3, *Characidium* sp4, *Characidium* sp5, *Characidium* sp6, *C. pterostictum*, *C. vestigipinne*, *C. rachovii*, *C. orientale*, *C. serrano*, *C. timbuiense*, *C. vidali* e *Characidium* sp. aff. *C. vidali* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa e bandamento C) e moleculares (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S, DNA telomérico (TTAGGG)_n e 4 sequências de microssatélites ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀), e pintura cromossômica através da microdissecção e amplificação do cromossomo sexual W de *C. gomesi* (sonda chamada de CgW). Além disso, foi realizado o sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição pela enzima SbfI (*RAD-tags*) através do sistema *Illumina Genome Analyzer* em machos e fêmeas de *C. gomesi*. Todas as espécies apresentaram número diploide de 2n=50 cromossomos, com predominância dos cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, além da ocorrência de cromossomos supranumerários em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e um par cromossômico acrocêntrico exclusivo detectado em *C. pterostictum*, *C. serrano* e *C. timbuiense*. Foi observada também a ocorrência de um sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais em distintos estágios de diferenciação em todas as espécies, com exceção de *Characidium cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmatosum*. A análise da heterocromatina constitutiva por bandamento C revelou a presença de heterocromatina nos cromossomos sexuais, principalmente no cromossomo W e em blocos intersticiais e/ou teloméricos nos braços longos do cromossomo Z e nos cromossomos Bs de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Sequências de DNAr 5S foram localizadas em diferentes cromossomos, com variação na quantidade de sítios entre as espécies, enquanto o DNAr 18S apresentou-se conservado em números de cromossomos portadores, porém variando na sua localização. De forma semelhante, a sequência para o snDNA U2 está distribuída também de forma conservada, com marcações apenas no primeiro par cromossômico metacêntrico, exceto em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *Characidium* sp2 que apresentaram as marcações no primeiro par submetacêntrico. Os resultados das hibridações com sonda telomérica mostraram a existência de espécies com diversos e variáveis sítios teloméricos intersticiais (ITS) e espécies com sinais cromossômicos apenas na posição terminal. A interpretação destes dados junto a uma análise

filogenética apontou que tais ITSs parecem ter surgido uma única vez na história evolutiva de *Characidium*. A sonda CgW marcou os cromossomos W de quase todas as espécies analisadas e as regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos Z, bem como toda extensão dos cromossomos Bs de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, evidenciando uma homologia e aparente origem comum entre os cromossomos sexuais nas espécies de *Characidium*, além de associar o cromossomo W com a origem destes cromossomos B. O mapeamento de 4 sequências de microssatélites foi realizado em seis espécies de *Characidium* e os resultados foram comparados com o mapeamento das sequências ribossômicas, visando compreender a organização das sequências repetitivas e o seu papel na diversificação dos cromossomos sexuais. Por fim, o sequenciamento de *RAD-tags* e suas análises possibilitou a geração de um conjunto de marcadores moleculares sexo-específico que serão utilizados identificar os mecanismos envolvidos na determinação sexual em *Characidium* e, por extensão, nos peixes. A integralização de abordagens cromossômicas e moleculares foi utilizada na tentativa de melhor compreender questões relacionadas à biologia evolutiva dos peixes do gênero *Characidium*.

Abstract

In the present study, eighteen species from the genus *Characidium* collected at different river basins were analyzed, including *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante*, *C. stigmatosum*, *Characidium* sp1, *Characidium* sp2, *Characidium* sp3, *Characidium* sp4, *Characidium* sp5, *Characidium* sp6, *C. pterostictum*, *C. vestigipinne*, *C. rachovii*, *C. orientale*, *C. serrano*, *C. timbuiense*, *C. vidali* e *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. The analyses involved classical (Giemsa conventional staining and C-banding) and molecular cytogenetic techniques (fluorescent *in situ* hybridization with ribosomal 5S and 18S, telomeric, microsatellite motifs and U2 snDNA probes, whole chromosome painting using W-specific probe obtained from *C. gomesi*-CgW). Besides that, DNA sequencing of restriction-associated DNA (RAD) was carried out in males and females of *C. gomesi*. All species showed diploid chromosome numbers of $2n=50$, with karyotypes mainly composed of meta- and submetacentric types, besides the occurrence of supernumerary chromosomes in *Characidium* sp. aff. *C. vidali* and one acrocentric pair in *C. pterostictum*, *C. serrano* e *C. timbuiense*. Also, almost all the analyzed species showed a ZZ/ZW sex chromosome system in distinct evolutionary stages, except *Characidium* cf. *zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmatosum*. The constitutive heterochromatin was located differentially on the W chromosomes and in interstitial and telomeric position on the Z chromosomes, as well as in the B chromosomes of *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. 5S rDNA was differentially distributed in the different species, with variations on the number of clusters per genome and position in the karyotype, while the 18S rDNA was conserved in number of sites per genome and variable in location. Conversely, the U2 snDNA distribution was conserved in a single homologous chromosome pair in all species, except in *Characidium* sp. aff. *C. vidali* and *Characidium* sp2. Telomeric probes revealed species with several interstitial telomeric sites (ITS), while other species showed only terminal signals. Phylogenetic analyses indicated that these ITSs emerged once in the evolutionary history of *Characidium*. The CgW probe marked the W chromosomes of almost all species and the pericentromeric and/or telomeric regions of the Z chromosomes, as well as the entire length of the B chromosomes of *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, pointing to a common origin of the sex system in this genus. Also, these results evidenced that the W chromosome might be the ancestor of B chromosomes. Physical mapping of 4 microsatellite motifs was carried out in six species of *Characidium* and the results were compared with ribosomal sites distribution to better

understand the genomic organization of these sequences and their role in the ZW sex chromosome diversification. Finally, the RAD-tags sequencing enabled to discover several sex-specific molecular markers that will be used to study the processes involved in the sex determination in *Characidium*. The integration of chromosome and molecular data was used to better understand the evolutionary biology of *Characidium* fishes.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Estudos citogenéticos clássicos e moleculares: caracterização da biodiversidade e evolução da Ictiofauna.....	1
1.2 O gênero <i>Characidium</i> : taxonomia e dados citogenéticos.	3
2 Objetivos.....	5
3 Materiais e métodos.....	7
3.1 Materiais	7
3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta.....	7
3.2 Métodos	11
3.2.1 Estimulação de Mitoses	11
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.....	11
3.2.3 Identificação da Heterocromatina Constitutiva	12
3.2.4 Extração do DNA genômico.....	13
3.2.5 Preparação das sondas de DNA para hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	13
3.2.5.1 Preparação das sondas de DNAr 5S e 18S	13
3.2.5.2 Preparação da sonda para snDNA U2	14
3.2.5.3 Preparação da sonda telomérica	15
3.2.5.4 Preparação das sondas de microssatélites (GA) ₁₅ , (GC) ₁₅ , (TTA) ₁₀ e (CA) ₁₅	15
3.2.5.5 Microdissecção	15
3.2.5.6 Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4 – Sigma)	16
3.2.5.7 WGA3 – Reamplificação e Marcação	17

3.2.5.8 Hibridação <i>in situ</i> (FISH)	17
3.3 Estudos Cariotípicos	19
3.4 Sequenciamento RAD-sequencing	19
3.4.1 Extração de DNA.....	19
3.4.2 Isolamento de marcadores RAD.....	19
3.4.3 Análise de sequências, montagem de <i>contigs</i> e detecção de SNPs	20
 4 Resultados e Discussão	 22
 4.1 Capítulo 1- Distribuição intersticial de sequências teloméricas nos cromossomos de <i>Characidium</i> (Teleostei, Characiformes)	 23
 4.2 Capítulo 2- Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em <i>Characidium</i> : organização genômica e diversificação dos cromossomos sexuais ZW.....	 35
 4.3 Capítulo 3- Diversidade cariotípica e evolução dos cromossomos sexuais ZZ/ZW em espécies do gênero <i>Characidium</i> : mapeamento de DNAs repetitivos e pintura do cromossomo W.....	 49
 4.4 Capítulo 4- Detecção de múltiplos SNPs e sequências associados ao sexo em espécies do gênero <i>Characidium</i> (Teleostei: Characiformes) a partir de <i>Characidium gomesi</i>	 68
 5 Considerações finais	 91
 6 Referências Bibliográficas	 93

1 Introdução

1.1 Estudos citogenéticos clássicos e moleculares: caracterização da biodiversidade e evolução da Ictiofauna

Impulsionados pelos avanços de novas técnicas de análise cromossômica, como bandamentos cromossômicos e localização de sequências nos cromossomos por meio de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos e têm possibilitado uma contribuição mais efetiva não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica nos vertebrados (Phillips & Reed 1996; Oliveira & Wright 1998). Estes avanços também se refletiram nos estudos cariotípicos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos, levando ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica, quanto dos processos evolutivos que envolvem o cariótipo dos peixes Neotropicais (Oliveira et al. 2007).

De forma geral, a grande variação da macroestrutura cariotípica de espécies de peixes Neotropicais e a ocorrência de distintos sistemas de heteromorfismos cromossômicos relacionados ao sexo, bem como de supranumerários tornam estes organismos importantes modelos de estudos evolutivos (Oliveira et al. 2009). Assim, o estudo citogenético sistematizado e contínuo de determinados grupos de peixes não só permitiu a descrição e caracterização dos números diploides das mais distintas espécies de peixes, como também possibilitou um melhor entendimento sobre os processos biológicos que norteiam a evolução destes organismos. Este tipo de abordagem tem sido aplicada, por exemplo, em peixes do gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes, Sternopygidae). Análises citogenéticas realizadas neste grupo, a partir do final da década de setenta, revelaram que, a despeito da ocorrência de uma única espécie, *Eigenmannia virescens*, para os rios de várias bacias brasileiras, na realidade trata-se de um complexo de espécies, com a ocorrência de cinco citótipos na bacia superior do rio Paraná, dois citótipos no rio São Francisco, três na região Amazônica, além de um extenso polimorfismo cromossômico na ilha de Marajó. Adicionalmente, os estudos citogenéticos neste grupo também evidenciaram a ocorrência de distintos sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria dos citótipos (revisão em Almeida-Toledo & Foresti, 2001).

Embora presente em muitos representantes de *Eigenmannia*, os heteromorfismos cromossômicos relacionados ao sexo encontrados neste grupo são bastante variáveis, podendo ser do tipo XX/XY (Almeida-Toledo & Foresti, 2001), $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo et al. 2000) ou ZZ/ZW (Silva et al. 2009), tornando necessária uma investigação significativa sobre a origem desses sistemas de determinação sexual. Nesse sentido, em estudo utilizando microdissecção e pintura cromossômica, Henning et al. (2008) verificaram que os sistemas XX/XY e $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ não eram homólogos entre si. Posteriormente, utilizando uma abordagem conjunta de análises filogenéticas com genes mitocondriais e microdissecção e pintura cromossômica, foi possível verificar a ocorrência de uma origem independente destes cromossomos, bem como datar o surgimento destes elementos na história evolutiva de *Eigenmannia* (Henning et al. 2011), o que reforça a importância de análises filogenéticas em estudos carioevolutivos. No entanto, a ausência de dados filogenéticos massivos para muitos grupos de peixes dificulta este tipo de abordagem, o que reflete na carência de trabalhos citogenéticos utilizando dados filogenéticos como base para a compreensão dos padrões de modificação cromossômica, como realizado por Poletto et al. (2010) em peixes ciclídeos e Fernandes-Matioli & Almeida-Toledo (2001) no gênero *Gymnotus*.

Por outro lado, a utilização de dados cariotípicos como números diploides, fórmulas cariotípicas, localização de sequências repetitivas e presença ou ausência de cromossomos sexuais como caracteres para ajudar na resolução de determinadas relações entre táxons e grupos também pode ser uma ferramenta interessante. Em estudo recente em peixes do gênero *Gymnotus*, Milhomem et al. (2013) realizaram FISH com sondas cromossômicas de DNAr 18S em várias espécies deste grupo e os dados obtidos suportaram apenas uma das filogenias moleculares obtidas anteriormente para o gênero (Albert et al. 2005; Lovejoy et al. 2010), constituindo um caso no qual os dados citogenéticos podem ser importantes para uma maior resolução das relações filogenéticas entre determinadas espécies, abordagem amplamente utilizada em pequenos mamíferos (Taberlet et al. 1994; Wang & Lan 2000; Volobouev et al. 2002; Veyrunes et al. 2005).

Estudos como estes revelam a importância da obtenção de dados cariotípicos das espécies, bem como da realização de estudos contínuos de determinados grupos, com a aplicação de técnicas resolutivas como a de FISH e bandamentos cromossômicos, que permitem alcançar resultados mais significativos sobre a evolução cariotípica e as relações filogenéticas existentes entre os grupos de peixes. Além disso, tais análises também permitem uma melhor compreensão sobre a organização estrutural de determinadas

sequências repetitivas e sua dinâmica nos genomas de eucariotos, bem como investigar as forças evolutivas às quais estas sequências estão submetidas.

1.2 O gênero *Characidium*: taxonomia e dados citogenéticos

O gênero de peixes *Characidium* está inserido na subfamília Characidiinae (Crenuchidae) e é constituído por cerca de 70 espécies (Eschmeyer 2015), apresentando uma ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá (*C. marshi*) até a Argentina (*C. rachovii*) (Buckup 2003). Embora estudos acerca da taxonomia e sistemática considerando uma grande quantidade de táxons já tenham sido realizados (Buckup 1993; Buckup & Reis 1997; Buckup 1998), ainda existe um enorme *gap* de informações sobre as relações evolutivas entre estas espécies e a sua distribuição geográfica, destacando-se a grande quantidade de espécies descritas nos últimos anos (Buckup & Hahn, 2000; Zarske & Géry 2001; Melo & Buckup, 2002; Taphorn et al. 2006; Graça et al. 2008; Silveira et al. 2008; Peixoto & Wosiacki, 2013; Netto-Ferreira et al. 2013; Leitão & Buckup 2014). Melo & Buckup (2002) ainda destacam que, até o ano de 2002, nenhuma espécie de *Characidium* havia sido descrita na região norte do estado de Goiás, região que abriga tributários de importantes bacias hidrográficas brasileiras, o que evidencia uma grande diversidade a ser investigada ainda.

Em adição à complexidade biogeográfica e taxonômica de *Characidium*, estudos citogenéticos também evidenciam uma considerável variabilidade cariotípica neste gênero, tanto em nível intraespecífico como interespecífico. No entanto, deve-se destacar que estes dados cariotípicos foram apresentados apenas a partir de meados da década de 90 (Miyazawa & Galetti Jr. 1994), sendo a grande maioria a partir dos anos 2000. Somado a este fato, também deve-se notar que a maior concentração de dados citogenéticos de *Characidium* são relativos às espécies da região Sul e Sudeste do Brasil, ainda assim, pequena diante de toda a diversidade deste grupo.

Até o momento, as espécies analisadas apresentam uma macroestrutura cariotípica bastante conservada, com número diploide constante de 50 cromossomos e predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Por outro lado, a identificação do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Noleto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a; Machado et al. 2011; Pazian et al. 2013; Pucci et al. 2014), a ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2014), e a presença de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) em diferentes cromossomos do cariótipo, inclusive nos cromossomos sexuais

(Maistro et al. 1998; Vicari et al. 2008; Pucci et al. 2014), além da ocorrência de indivíduos poliploides (Centofante et al. 2001; Pansonato-Alves et al. 2011b), evidenciam que *Characidium* constitui um excelente modelo para estudos carioevolutivos.

As variações cariotípicas observadas em diferentes espécies de *Characidium* estão relacionadas principalmente a eventos cromossômicos envolvendo os padrões de heterocromatina constitutiva e parecem convergir, como destacado por Pansonato-Alves et al. (2010), para a formação de dois grupos de espécies neste gênero. Um primeiro grupo é caracterizado por apresentar heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos e ausência de cromossomos sexuais, do qual fazem parte espécies capturadas em rios da bacia do Tietê, como *C. cf. zebra*, (Miyazawa & Galetti Jr. 1994; Pansonato-Alves et al. 2011b; Pazzian et al. 2013; Pucci et al. 2014), da bacia do Mogi-Guaçu, *C. cf. zebra*, *Characidium* sp. e *C. cf. lagosantensis* (Miyazawa & Galetti Jr. 1994; Pazzian et al. 2013), da bacia do rio Grande, *C. cf. zebra*, (Centofante et al. 2001) e da bacia do rio Paraíba do Sul, *C. lauroi* (Centofante et al. 2003). Por outro lado, espécies encontradas em rios da bacia do Paranapanema, como *Characidium* sp. *aff. C. gomesi*, (Maistro et al. 2004) e *C. cf. gomesi* (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2011a), *C. schubarti* (Pansonato-Alves et al. 2010) da bacia do rio Grande, *C. gomesi*, (Centofante et al. 2001), da bacia do alto rio Tietê, *C. oiticicai* (Pansonato-Alves et al. 2010), da bacia do Paraíba do Sul, *Characidium* sp. *cf. C. alipioi*, (Centofante et al. 2003), *C. lauroi* (Pansonato-Alves et al. 2010), dos rios costeiros, *C. lanei*, (Noleto et al. 2009), *C. pterostictum* (Pansonato-Alves et al. 2010), *C. cf. fasciatum* da bacia do rio São Francisco (Pazzian et al. 2013) e *C. heirmostigmata* da bacia do rio Ivaí (Pucci et al. 2014) constituem um segundo grupo, pois evidenciam, além da heterocromatina pericentromérica e telomérica observada nos representantes do primeiro grupo, também grandes blocos intersticiais e/ou terminais e sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ/ZW, sendo a heterocromatinização parcial ou até mesmo total do cromossomo W uma característica comum às espécies deste grupo 2 (Vicari et al. 2008; Noleto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, Pazzian et al. 2013; Pucci et al. 2014).

Tendo por base um conjunto de evidências citológicas e filogenéticas, alguns autores consideram que a origem do sistema ZZ/ZW em *Characidium* ocorreu uma única vez (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010, Pazzian et al. 2013; Pucci et al. 2014; Pansonato-Alves et al. 2014), enquanto eventos posteriores foram responsáveis pela diversificação destes cromossomos. Nesse sentido, a ausência de cromossomos sexuais diferenciados morfológicamente em *C. zebra*, espécie considerada basal na filogenia de

Characidium (Buckup 1993), e em *Crenuchus spilurus*, espécie da subfamília Crenuchinae e família Crenuchidae, e a existência de homologia entre os cromossomos W presentes em diferentes espécies, apontam para uma origem comum destes cromossomos sexuais na linhagem de *Characidium*.

Deve ser considerado, portanto, diante do exposto que a determinação da extensão da ocorrência do sistema sexual ZZ/ZW poderia fornecer informações concretas sobre a diversificação cariotípica e contribuir para o conhecimento das relações filogenéticas e evolutivas neste grupo de peixes, bem como ampliar o conhecimento sobre a história evolutiva e os processos de modificação cromossômica responsáveis pela extensa diversidade estrutural dos cromossomos sexuais neste grupo biológico. Assim, o mapeamento de sequências de DNA repetitivo (DNA telomérico, DNAs ribossomais e snDNA U2, entre outros) e de sequências de microssatélites certamente deverão contribuir para uma melhor compreensão dos rearranjos cromossômicos e da organização estrutural destas sequências, bem como sobre sua dinâmica no genoma de *Characidium*. Por fim, a busca por marcadores moleculares sexo-específico serão úteis para um entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de determinação sexual nos representantes deste gênero e, por extensão, nos peixes.

2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em identificar as e as características cromossômicas em representantes de peixes do gênero *Characidium*, incluindo aquelas que apresentam sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW, com a aplicação de técnicas citogenéticas e moleculares, mapeando e comparando a localização cromossômica de sequências específicas de DNA em espécies e populações que ocorrem em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, bem como realizar a busca por marcadores moleculares sexo-específico, com a finalidade de:

- 1 ampliar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica neste grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies e populações que ocorrem nos componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras;
- 2 localizar e mapear os genes de DNA repetitivo (DNA ribossômico 5S e 18S e o gene U2), identificando sua posição cromossômica e estabelecer as relações entre espécies e populações com a utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH);

3 localizar e mapear o DNA telomérico em um grupo previamente selecionado de espécies do gênero *Characidium* com o objetivo de entender melhor a relação entre as marcações teloméricas intersticiais encontradas e a heterocromatina constitutiva. Além disso, verificar a possível existência de sítios teloméricos intersticiais nos cromossomos acrocêntricos de *C. pterostictum*, *C. timbuiense* e *C. serrano*, os quais acredita-se terem surgido através de uma inversão pericêntrica;

4 realizar pintura cromossômica com o uso da sonda CgW produzida por microdissecção a partir do cromossomo sexual W de *C. gomesi*, com o objetivo de avaliar a identidade de composição e diferenciação dos cromossomos sexuais, inferindo sobre a evolução deste sistema em espécies de *Characidium*;

5 caracterizar a localização cromossômica de quatro tipos de microssatélites nos genomas de diferentes espécies de *Characidium*, comparar com a distribuição de DNAs ribossomais e investigar se o processo de heterocromatinização e diferenciação dos cromossomos sexuais está diretamente associado com o acúmulo destes microssatélites nos cromossomos sexuais;

6 aplicar a técnica de restrição enzimática (com a enzima SbfI) combinada com o sequenciamento de DNA associado aos sítios de restrição (RAD-markers) através do sistema *Illumina Genome Analyzer*, buscando fragmentos polimórficos relacionados ao sexo dos exemplares como fonte de informações para o entendimento do processo de determinação sexual nos peixes do gênero *Characidium*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

No presente trabalho foram analisadas citogeneticamente dezoito espécies de peixes do gênero *Characidium*, sendo *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *Characidium* sp1, *Characidium* sp2, *Characidium* sp3, *Characidium* sp4 e *Characidium* sp5, três populações de *C. pterostictum*, *C. vestigipinne*, *C. rachovii*, *C. orientale*, *Characidium* sp6, *C. serrano*, *C. xavante*, *C. timbuiense*, *C. vidali*, *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *C. stigmosum* coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras indicadas na Tabela 1, além de *C. lanei* e *C. lauroi* através de material citogenético disponível no laboratório descritos em Pansonato-Alves et al. (2010) e duas populações de *C. gomesi* para produção da sonda do W e na preparação de RAD-tags (Tabela 1 e Figura 1).

De cada indivíduo, foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 5%, conservados em álcool 70% e após identificação foram depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Tabela 1. Exemplares de peixes do gênero *Characidium* analisados. Destaque para presença/ausência de sistema de cromossomos sexuais. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Espécies	LBP	Localidade	Cromossomo sexual ZZ/ZW	Coordenadas
<i>C. cf. zebra</i>	14905	Rio Das Antas – Bacia do rio Paraguai – Tangará da Serra – MT	Ausente	S 14°38'16.00'' W 57°09'03.52''
<i>C. cf. zebra</i>	14907	Córrego Cancela – Bacia do rio Paraguai – Nobres - MT	Ausente	S 14°42'32.35'' W 56°15'54.58''
<i>C. tenue</i>	14514	Rio Chuí – Chuí - RS	Ausente	S 33°41'22.6'' W 53°26'22.3''
<i>Characidium</i> sp2	14903	Rio Russo – Bacia do rio Paraguai - MT	Presente	S 14°36'12.73'' W 57°40'51.79''
<i>Characidium</i> sp3	14906	Rio Vermelho – Bacia do rio Paraguai – Tangará da Serra - MT	Presente	S 14°20'33.12'' W 57°31'25.68''

<i>Characidium</i> sp4	14904	Rio Arinos – Bacia Amazônica – Nova Mutum - MT	Presente	S 13°48'03'' W 56°01'38''
<i>Characidium</i> sp5	14908	Rio Nanay – Bacia Amazônica - Iquitos – Peru	Presente	S 3° 46' 37.18'' W 73° 20' 09. 37''
<i>C. pterostictum</i>	14672	Afluente do rio Jacuí - Bacia Costeira -Cruz Alta - RS	Presente	S 28°38'43.9'' W 53°33'35.7''
<i>C. pterostictum</i>	14456	Drenagem da Bacia Tramandaí – Caraá - RS	Presente	S 29°46'34.1'' W 50°26'34.1''
<i>C. pterostictum</i>	14901	Lagoa Itapeva –Três Forquilhas - RS	Presente	S 29°31'009'' W 50°05'37.5''
<i>C. rachovii</i>	19566	Banhado arroio cabeças – Rio Grande - RS	Presente	S 32°05'24,1'' W 52°15'09.7''
<i>C. orientale</i>	19561	Arroio chasqueiro – Arroio Grande – RS	Presente	S 32°11'26,3'' W 52°59'30.5''
<i>C. serrano</i>	19568	Arroio Canoinha – Entre Pirapó e São Nicolau - RS	Presente	S 28°08'01,8'' W 55°13'56.9''
<i>C. vestigipinne</i>	19567	Cabeceira do rio Caraguatá – Coxilha - RS	Presente	S 28°08'03,4'' W 52°18'40.7''
<i>Characidium</i> sp6	19563	Arroio Canoinha – Entre Pirapó e São Nicolau - RS	Presente	S 28°08'01,8'' W 55°13'56.9''
<i>C. xavante</i>	19569	Tributário rio Xingu – Paranatinga - MT	Ausente	S 14°25'33.8'' W 54°00'56.6''
<i>C. timbuiense</i>	19565	Córrego Valsugana Velha – Santa Teresa – ES	Presente	S 19°58'32.56'' W 40°32'53.15''
<i>C. vidali</i>	19570	Córrego Bananeiras – Silva Jardim – RJ	Presente	S 22°28'51.79'' W 42°23'39.06''
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	19571	Córrego Bananeiras – Silva Jardim – RJ	Presente	S 22°28'51.79'' W 42°23'39.06''
<i>C. gomesi</i>	6733	Ribeirão Alambari – Botucatu - SP	Presente	S 22° 56' 06.99'' W 48° 19' 18.23''
<i>C. gomesi</i>	16908	Véu da Noiva	Presente	S 23°01'26'' W 48°49'32''
<i>C. lanei</i>	8700	Rio Cari – Morretes – PR	Presente	S 25°26'29'' W 48°32'28''

<i>C. lauroi</i>	8741	Rio Grande – Ubatuba - SP	Presente	S 23°23'42" W 45°07'17"
<i>C. stigmatosum</i>	19560	Tributário Córrego Ave Maria - Cavalcante - GO	Ausente	S 13°45' 18.5" W 47° 27' 20.0"



Figura 1: Exemplos de *Characidium* estudados até o presente momento. *Characidium* sp2; *Characidium* sp3; *Characidium* sp4; *Characidium* sp5; *Characidium pterostictum*; *Characidium tenue*; *Characidium rachovii*; *Characidium orientale*; *Characidium vestigipinne*; *Characidium serrano*; *Characidium* cf. *zebra*; *Characidium xavante*, *Characidium stigmatosum*; *Characidium timbuiense*, *Characidium vidali* e *Characidium* sp. aff. *C. vidali* respectivamente. A barra equivale 1 cm.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole & Leavens 1971), preparação direta de células renais (Foresti et al. 1981) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH para a localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e 18S, snDNA U2, sequências teloméricas (TTAGGG)_n, detecção dos microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅ e para a pintura do cromossomo W.

3.2.1 Estimulação de Mitoses

Para obtenção de maior número de células em mitose foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por meio da inoculação intramuscular de suspensão de células de fermento biológico, conforme técnica descrita por Cole & Leavens (1971) para anfíbios e répteis e adaptada para peixes por Oliveira et al. (1988). O procedimento utilizado consiste em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischman) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 10 minutos;
- 3) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado, por cerca de 48 horas.

Fragmentos de tecidos de rim e brânquias foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas visando o estudo cariotípico das espécies.

3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti et al. (1981), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão *in vitro*, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consiste em:

- 1) anestésiar o animal em solução de benzocaína a 0,01%;

- 2) sacrificar o animal, retirando o rim anterior. Transferir o material para uma pequena placa de vidro, contendo 10 ml meio de cultura RPMI previamente aquecido em estufa a 37°C;
- 3) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até obter uma solução aquosa homogênea;
- 4) adicionar 2 gotas, com uma seringa de 1ml, de colchicina a 0,01% e levar a estufa a 37°C por 30 minutos;
- 5) centrifugar (1000 rpm) por 10 minutos e descartar o sobrenadante;
- 6) acrescentar 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C e levar a estufa 37°C por 21 minutos;
- 7) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 8) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 minutos;
- 9) pingar o material em lâminas;
- 10) deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para aplicação de várias técnicas de bandamento cromossômico e FISH.

3.2.3 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

Essa técnica caracteriza-se pela ação sequencial de base, ácido e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas. O procedimento foi seguido conforme descrito por Sumner (1972), com adaptações, e consiste em:

- 1) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2 N por 25 minutos, a temperatura ambiente;
- 2) lavar com água destilada, a temperatura ambiente;
- 3) incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60°C, por 5 a 15 segundos;
- 4) lavar rapidamente em HCl 1 N, a 60°C, por alguns segundos;
- 5) incubar a lâmina em 2XSSC, a 60°C, por 25 minutos;
- 6) lavar com água destilada à temperatura ambiente;
- 7) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

3.2.4 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) conforme instruções do fabricante.

3.2.5 Preparação das sondas de DNA para FISH

3.2.5.1 Preparação das sondas de DNAr 5S e 18S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Characidium gomesi*, usando os primers 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3') (White et al. 1990). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada primer (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min
35 ciclos	{ 95°C ---- 45 seg
	{ 52,1°C ---- 45 seg
	{ 72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min
	12°C ---- manutenção

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Characidium gomesi*, usando os primers 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás et al. 1994). Esta sonda foi marcada com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR, a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq

polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 2 µl de biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min	
35 ciclos	{	95°C ---- 1 min
		55°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1 min
		72°C ---- 7 min
		12°C ---- manutenção

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.5.2 Preparação da sonda para snDNA U2

A sonda utilizada para detecção de sequências snDNA U2 foi obtida por PCRa partir do DNA total de *Characidium gomesi*, usando os primers U2F (59-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G–39) e U2R (59-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-39) (Bueno et al. 2013). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada primer (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min	
35 ciclos	{	95°C ---- 45 seg
		52,1°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1 min e 30 seg
		72°C ---- 5 min
		12°C ---- manutenção

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.5.3 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP. Na ausência de DNA molde, foram usados *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991) e os parâmetros para marcação foram: 33,9 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 1 µl Digoxigenina-11-dUTP, 1,5 µl de cada primer (10mM), 0,4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 10 min
35 ciclos	{ 94°C ---- 45 seg
	{ 50°C ---- 1 min
	{ 72°C ---- 1 min
	{ 72°C ---- 7 min
	12°C ---- manutenção

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.5.4 Preparação das sondas de microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅

As sondas de oligonucleotídeos que contêm as sequências dos microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅ foram marcadas diretamente com TAMRA na posição 5`durante sua síntese pela empresa Sigma-Aldrich, como descrito posteriormente em Kubat et al. (2008).

3.2.5.5 Microdissecção

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica (Mühlmann et al. 1995) consistiram em:

1. Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente.

2. Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH_2PO_4 0,06M e Na_2HPO_4 0,449M, pH 6.8) durante 8-10 minutos.

3. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.

4. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder à microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro acoplada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf).

5. Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR com solução de suspensão.

3.2.5.6 Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4 – Sigma) (Gribble et al. 2004)

Esta reação consistiu na fragmentação aleatória não enzimática do DNA genômico seguida pela ligação de adaptadores com os dois locais de iniciação de PCR específicos para ambas as extremidades de cada fragmento conforme proposto por Marshall et al. (2004).

Passo 1 - Fragmentação: Adicionar 1 μl da solução Lysis and Fragmentation Buffer (0,5 μl de proteinase K + 8 μl de tampão 10x) ao tubo contendo os cromossomos microdissecados. Incubar o mix de DNA a 50°C por 1 hora, aquecer por exatos 4 minutos a 99°C, manter no gelo e centrifugar brevemente antes de preparar a biblioteca.

Passo 2 – Preparação da Biblioteca: Para a preparação da biblioteca foram adicionados ao tudo de PCR 2 μl de Single Cell Library Preparation e 1 μl de Library Stabilization Solution. A amostra foi colocada em termociclador a 95°C por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1 μl de Library Preparation Enzyme, e a amostra foi colocada em termociclador e submetida as seguintes condições:

16°C ----- 20 min

24°C ----- 20 min

37°C ----- 20 min

75°C ----- 5 min

12°C --- manutenção

Passo 3 – Amplificação: Na sequência, foi realizada uma reação de amplificação, adicionando 48,5 µl de água ultrapura, 7,5 µl de 10x Amplification Master Mix e 5,0 µl de WGA DNA polimerase. A amostra foi submetida ao seguinte programa:

25 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 3 \text{ min} \\ 94^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 30 \text{ seg} \\ 65^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 5 \text{ min} \end{array} \right.$
12°C ---- manutenção

O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%.

3.2.5.7 WGA3 – Reamplificação e Marcação.

Para a reação de reamplificação foi preparado os parâmetros foram: 15 µl de água livre de nuclease, 2,5 µl de Amplification Master Mix (10X), 1,7 µl de WGA DNA polimerase, 1 µl de dNTP (2mM cada), 0,3 µl de dTTP (2mM), 0,7 µl Digoxigenina-11-dUTP (1mM), 2 µl de DNA molde. A amostra foi submetida ao seguinte programa:

14 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 3 \text{ min} \\ 94^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 15 \text{ seg} \\ 65^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 5 \text{ min} \end{array} \right.$
12°C ---- manutenção

O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%.

3.2.5.8 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

O mapeamento das sondas composta por DNA repetitivo e da sonda do cromossomo W produzida por microdissecção em cromossomos metafásicos foi realizado por FISH de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho.

Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37°C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM por 10 minutos a 37°C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Após a secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70% a 70°C por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) contendo 3-6 µL de sonda marcada por 10 minutos a 100°C. Posteriormente, 15 µL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37°C *overnight*.

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC, e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxi-rodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector).

Para os microssatélites as lâminas foram lavadas 2 vezes em 2X SSC por 5 minutos e 1 vez em 1X PBS por 1 minuto em temperatura ambiente. Depois as lâminas foram secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). Todas as lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.3 Estudos Cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos), coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 12.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan et al. (1964).

3.4 Sequenciamento RAD-sequencing

3.4.1 Extração de DNA

O DNA das amostras foram extraídos de músculo e/ou fígado do peixe com a utilização do Kit NucleoSpin® Tissue Columns, Collection Tubes (2 mL), Proteinase K (PRODIMOL) e tratadas com RNase A (20 mg/ml - Invitrogen) para remoção do RNA residual das amostras. Cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (Nanodrop) e a qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Após estes procedimentos, as amostras foram diluídas em uma concentração de 50 ng/mL em 5 mmol/L Tris, pH 8.5.

3.4.2 Isolamento de marcadores RAD

A construção das bibliotecas foi realizada em dois pools, ambos contendo machos e fêmeas mesclados. Os protocolos utilizados seguiram os procedimentos descritos por Baird et al. (2008), detalhado em Etter et al. (2011) com pequenas modificações feitas em Houston et al. (2012). Os adaptadores específicos RAD paired-ends P1 e P2, a amplificação das bibliotecas por PCR e as sequências dos primers que foram usadas neste estudo estão detalhados em Baxter et al. (2011). O procedimento geral de aplicação dos protocolos da técnica se resume em:

1) preparar dois pools das amostras contendo material de machos e fêmeas de *C. gomesi*, incorporando uma combinação única de 3 diferentes bases nucleotídicas (barcoding) para cada indivíduo;

2) efetuar uma digestão enzimática deste material escolhendo uma enzima de restrição adequada de 8bp (SbfI) que permita a obtenção de um número de fragmentos suficiente para uma varredura genômica (sobre 5000), com uma profundidade adequada para calcular as frequências dos SNPs e que possibilite a detecção da associação;

3) ligar um adaptador P1 (Solexa – Illumina) nos produtos dessa digestão e fragmentar este material em segmentos de tamanho aproximado de 500bp;

4) correr um gel de agarose contendo este material e extrair um arrasto de DNA com tamanho aproximado entre 300-800bp e purificar estas amostras com MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen);

5) utilizar o kit QuickBlunting Kit (NEB) para preparar as amostras e usar o fragmento Klenow (NEB) para adicionar uma cauda poli-A, purificar as amostras;

6) ligar o adaptador P2 – Paired-End (Illumina) aos fragmentos, purificar e eluir as amostras e utilizar este material para realizar uma amplificação seletiva dos fragmentos que contêm os adaptadores P1 e P2;

7) quantificar as amostras por qPCR para controle de qualidade e para um bom rendimento das sequências geradas.

Após toda a preparação das bibliotecas, as amostras foram diluídas a 10nM e sequenciadas, utilizando o módulo Paired-End do Genome Analyzer II 100bp (HiSeq2500), seguindo o protocolo RTA 1.12.4.2 e Casava 1.6 (Illumina).

3.4.3 Análise de sequências, montagem de *contigs* e detecção de SNPs.

Todas as análises bioinformáticas foram realizadas de forma concomitante e complementar em diferentes Instituições: *i*) Universidade de Santiago da Compostela, Lugo, Espanha, sob supervisão do Dr. Paulino Martinez Portela e Dr. Miguel Hermida; *ii*) Universidade de Stirling, Stirling, Reino Unido, sob supervisão do Dr. John B. Taggart e Dr. Michaël Bekart; e *iii*) University College London (UCL), Inglaterra, sob a supervisão da Dra. Judith Mank e *iv*) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil sob supervisão do Dr. Fausto Foresti.

Para a análise das sequências foi utilizado o *software* Stacks ware 0,999991 (Catchen et al. 2011). Este programa é utilizado para “*short-read sequence data*” com o objetivo de

identificar e genotipar *loci* em um grupo de amostras ou indivíduos, seja por uso de comparação com um genoma de referencia ou genotipagem *de novo*. Este *software* é composto por diversos módulos implementados em C++ com alguns programas em Perl, podendo ser aplicado em qualquer sistema baseado em GNU-Linux. Os diferentes módulos podem ser executados de maneira individual ou na sequência de um “*pipeline*”. Os *reads paired-end* de cada RAD-tag sequenciado foram extraídos através do Stacks e do Veler Assembler version 1.2.08 (Zerbino et al. 2008). Como os indivíduos identificados por um *barcode* específico, cada indivíduo foi atribuído à uma população (macho ou fêmea) para os cálculos de diferenciação populacional.

Para a seleção dos SNPs foram utilizados os valores dos índices de fixação *Fst* entre os sexos através do programa GenePop 4.2 (Rousset 2008). Foram selecionados os *loci* que apresentarem $Fst \geq 0.10$ entre machos e fêmeas, ou qualquer *locus* que se apresentou exclusivamente nas fêmeas. Feita esta seleção, uma busca de similaridade destas sequências foi realizada no banco de dados NCBI, contra o genoma de referência de *Danio rerio* e no Repbase.

4 Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Characidium* foram organizadas na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir. O Capítulo 1 já se encontra publicado e sua versão encontra-se em anexo no final desta tese.

4.1 Capítulo 1

Distribuição intersticial de sequências teloméricas nos cromossomos de *Characidium* (Teleostei, Characiformes)

4.2 Capítulo 2

Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *Characidium* (Teleostei: Characiformes): organização genômica e diversificação dos cromossomos sexuais ZW

4.3 Capítulo 3

Diversidade cariotípica e evolução dos cromossomos sexuais ZZ/ZW em espécies do gênero *Characidium* (Teleostei: Characiformes): mapeamento de DNAs repetitivos e pintura do cromossomo W

4.4 Capítulo 4

Deteção de múltiplos SNPs e sequências associados ao sexo em espécies do gênero *Characidium* (Teleostei: Characiformes) a partir de *Characidium gomesi*

Capítulo 1

Distribuição intersticial de sequências teloméricas nos cromossomos de *Characidium* (Teleostei, Characiformes)

Resumo

Characidium é um gênero composto por pequenas espécies de peixes de água doce que apresentam números diploides e fórmulas cariotípicas bastante conservados. No presente estudo uma análise citogenética comparativa utilizando sondas de DNA telomérico em nove espécies de *Characidium* foi realizada. Simultaneamente aos estudos cariotípicos, uma análise filogenética foi realizada através do sequenciamento dos genes mitocondriais Citocromo oxidase C subunidade I (COI) e Citocromo B (Cyt B) com o intuito de investigar a direção evolutiva das alterações cromossômicas observadas. Os resultados da hibridação *in situ* fluorescente mostraram a existência de espécies com diversos e variáveis sítios teloméricos intersticiais (ITS) e espécies com sinais cromossômicos apenas na posição terminal. Os dados obtidos pela filogenia molecular apontam que tais ITSs encontrados surgiram uma única vez na história evolutiva de *Characidium*, sendo propagados diferencialmente nas distintas espécies/populações que apresentam estes sítios. Além disso, a origem de um par cromossômico acrocêntrico exclusivo detectado em *C. pterostictum*, *C. serrano* e *C. timbuiense* também foi investigada, revelando uma possível origem comum deste par nestas espécies. Os dados apresentados aqui evidenciam a ocorrência de alterações genômicas contínuas e intensas entre as espécies de peixes do gênero *Characidium*.

Introdução

Telômeros são regiões protetoras funcionais e estão localizadas na região terminal dos cromossomos eucarióticos (Blackburn & Greider 1995). Em geral, as funções dos telômeros estão associadas com a manutenção da estrutura cromossômica, protegendo os cromossomos de fusões *end-to-end* e degradação (Bourgain & Katinka 1991; Blackburn & Greider 1995; van Steensel et al. 1998). O DNA telomérico é composto por repetições em *tandem* e podem variar significativamente em seu tamanho, tanto entre as espécies quanto entre os cromossomos de um único indivíduo (Meyne et al. 1989; Takubo et al. 2002; Garrido-Ramos & López-Flores 1999). No grupo dos vertebrados, estas repetições foram identificadas como a sequência (TTAGGG)*n* (Meyne et al. 1989).

Vários métodos para a avaliação das sequências teloméricas estão disponíveis, incluindo a hibridação *in situ* fluorescente (FISH; Saldanha et al. 2003). No grupo dos peixes, o mapeamento cromossômico utilizando sonda de DNA telomérico já foi realizado em aproximadamente 80 espécies (Ocalewicz 2013). Em geral, estes estudos visaram a caracterização de sítios teloméricos intersticiais (ITSs), os quais são relacionados a rearranjos cromossômicos, tais como fusões e/ou inversões (Ocalewicz 2013; Ocalewicz et al. 2013). No entanto, a ocorrência de ITSs sem qualquer relação com fusões cromossômicas já foi demonstrada em diferentes organismos (Garrido-Ramos et al. 1999; Nanda et al. 2009).

O gênero *Characidium* representa o grupo de peixes mais especioso da família Crenuchidae e seus representantes estão amplamente distribuídos pelos rios da região Neotropical (Buckup 2003). Estudos citogenéticos realizados nos representantes deste grupo revelam a ocorrência de alterações significativas no nível sub-cromossômico de resolução, como uma diversificação substancial na localização de sítios de DNA ribossômico tanto em nível intraespecífico, como interespecífico (Vicari et al. 2008a; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Por outro lado, as espécies analisadas apresentam uma macroestrutura cariotípica bastante conservada, com número diploide de 50 cromossomos e predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos; exceto *C. pterostictum* e *Characidium* sp. que apresentam um par cromossômico do tipo acrocêntrico (Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Tal homogeneidade no cariótipo indica que rearranjos macro-cromossômicos (ex: fusão e/ou fissão) não são os principais mecanismos de diversificação cariotípica neste grupo. Entretanto, análises citogenéticas em uma população de *C. pterostictum* revelaram a ocorrência de ITSs em diversos pares cromossômicos (Pansonato-Alves, dados não publicados).

Pansonato-Alves et al. (2014) destacaram que análises filogenéticas podem ser consideradas um excelente complemento para estudos citogenéticos, pois podem revelar o sentido evolutivo das alterações cromossômicas. Embora esta abordagem represente uma ferramenta poderosa para avaliar homologias cromossômicas (Milhomem et al. 2013) e a origem de cromossomos específicos, como cromossomos sexuais ou supranumerários (Pansonato-Alves et al. 2014) este tipo de análise é dificultada no grupo de peixes, principalmente porque as informações filogenéticas não estão disponíveis para muitos grupos.

Neste sentido, no presente trabalho foram estudadas as localizações cromossômicas de sequências teloméricas em nove espécies de *Characidium* visando analisar a ocorrência e extensão de ITSs nos cromossomos dos representantes deste gênero. Os resultados obtidos

mostraram algumas espécies com um número variável de ITS, enquanto outras só apresentaram sinais terminais em seus cromossomos. A partir destes resultados, uma relação filogenética entre as espécies estudadas através de dados moleculares foi inferida com o intuito de investigar: i) o monofiletismo entre as espécies que apresentaram os ITSs e; ii) a ocorrência de um único evento responsável pela origem dos cromossomos acrocêntricos em três espécies deste gênero.

Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizadas nove espécies de *Characidium* coletadas em diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 1). Os animais foram coletados de acordo com a legislação brasileira de proteção ambiental (Permissão MMA/IBAMA/SISBIO – número 3245) e os procedimentos de coleta, manutenção e análise dos peixes foram aprovados (Protocolo 595) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP. Após as análises, todos os espécimes foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 1).

As suspensões celulares e os tecidos das espécies *C. cf. zebra*, *C. gomesi*, *C. lanei*, *C. lauroi* e *C. schubarti* já estavam disponíveis no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu e seus cariótipos foram descritos em trabalhos anteriores (Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, b). Já as espécies *C. vidali*, *C. serrano* e *C. timbuiense* e duas populações de *C. pterostictum* foram coletadas e analisadas pela primeira vez no presente estudo. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de suspensões celulares dos tecidos renais anterior de acordo com o protocolo utilizado por Foresti et al. (1981). O bandamento-C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972). Os cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a) (Levan et al. 1964).

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991).

As condições de hibridação foram as mesmas para cada amostra analisada utilizando condições de alta estrigência de acordo com os procedimentos descritos em Pinkel et al. (1986). As lâminas foram incubadas com RNase (50 µg/ml) durante 1h à 37°C, e o DNA cromossômico foi denaturado em formamida/2xSSC 70% durante 5min à 70°C. Para cada

lâmina, foram utilizados 30µl de solução de hibridação (contendo 200ng de sonda marcada, formamida 50%, 2xSSC e sulfato dextrano 10%) desnaturados durante 10 min a 95°C, colocados sobre as lâminas e hibridado em câmara húmida com 2xSSC a 37°C *overnight*. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas em 0,2xSSC/15% formamida por 20min a 42°C, seguido por uma segunda lavagem em 0,1xSSC por 15min a 60°C e uma lavagem final em temperatura ambiente de 4xSSC/0,5% Tween por 10min. Para a detecção da sonda, foi usada antidigoxigenina-rhodamina (Roche). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories).

As sequências de DNA mitocondrial COI e CytB usadas para as populações de *C. gomesi*, *C. schubarti* e *C. lanei* foram retiradas do GenBank (GenBank número de acesso COI KF914693 a KF914710 e CytB KF914671 a KF914692). Adicionalmente, estas regiões foram sequenciadas para as espécies *C. cf. zebra*, *C. vidali*, *C. lauroi*, *C. serrano*, *C. timbuiense*, duas populações de *C. pterostictum* (Lagoa Itapeva e rio Jacuú) e para a espécie *Ammocryptocharax elegans* (grupo externo). Ambos os genes foram amplificados por PCR de um indivíduo de cada espécie de acordo com os métodos convencionais, utilizando os conjuntos de *primers*: Cytb- L14841 + Cytb-H15149 (Kocher et al. 1989) e Fish- F1 + FishR1 (Ward et al. 2005). O número de acesso no GenBank para estas sequências são KM229364–KM229369 (COI) e KM229370–KM229375 (CytB).

O consenso das sequências *forward* e *reverse* foi obtido através do programa Geneious Pro 5.4.2 (Drummond et al. 2006) e o alinhamento foi gerado pelo programa MUSCLE algorithm (Edgar 2004) utilizando os parâmetros padrão. As sequências de cada gene foram alinhadas separadamente e depois concatenadas em um único conjunto de dados. Após o alinhamento, o conjunto de dados foi verificado manualmente a fim de evitar quaisquer desalinhamentos ou casos potenciais de erros. Após estes procedimentos, foi verificada a presença de *stop* códons no programa Geneious Pro 5.4.2. Para avaliar a ocorrência de saturação, estimou-se o índice de Iss no DAMBE 5.2.31 (Xia & Xie 2001), como descrito em Xia et al. (2003) e Xia & Lemey (2009), e a taxa de transcrições/transversões também foi avaliada utilizando o software DAMBE 5.2.31 (Xia & Xie 2001). A matriz de dados foi dividida em seis partições, cada uma representando uma posição diferente do códon de cada gene. O melhor modelo evolutivo para cada partição foi estimada com o Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998).

A inferência Bayesiana (BI) (Huelsenbeck & Ronquist 2001) foi realizada para avaliar as topologias de árvores alternativas através da estimação de probabilidades posteriores

usando o MrBayes v3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Oito cadeias foram executadas simultaneamente para 10.000.000 de gerações e cada árvore foi amostrada a cada 100 gerações. A análise acima foi realizada duas vezes. A distribuição dos *scores* de *log-verossimilhança* foi examinada usando o Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2007a) para determinar a fase estacionária de cada busca e avaliar se as corridas extras foram necessárias para atingir a convergência. Todas as topologias amostradas abaixo da assíntota (2.500.000 gerações) foram descartadas como parte de um processo de *burn-in*. Todas as árvores restantes foram usadas para construir uma árvore consenso no programa TreeAnnotator v.1.6.2 (Rambaut & Drummond 2007b).

Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram um número diploide conservado de 50 cromossomos, composto principalmente por cromossomos meta e submetacêntricos, exceto *C. timbuiense*, *C. serrano* e *C. pterostictum*, que apresentaram um par cromossômico do tipo acrocêntrico (Figura 1). O bandamento-C mostrou blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e evidenciou os cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em todas as espécies, exceto para *C. cf. zebra* (Figura 2). Além disso, blocos heterocromáticos polimórficos na região terminal no braço longo do par cromossômico acrocêntrico de *C. pterostictum* e *C. serrano* foram detectados (Figuras 2h, l, p).

A aplicação da técnica de FISH com a sonda telomérica (TTAGGG)_n revelou, além das marcações em posição terminal de todos os cromossomos, sinais intensos em posição intersticial para algumas espécies, incluindo *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. lanei*, *C. timbuiense*, *C. pterostictum* e *C. serrano* (Figura 1). Estas marcações teloméricas intersticiais foram coincidentes com blocos heterocromáticos e apresentaram variações entre diferentes espécies e mesmo entre diferentes populações de uma mesma espécie (ex: *C. pterostictum*) em número e posição do genoma (Figuras 1, 2). Adicionalmente, as espécies *C. lauroi*, *C. timbuiense*, *C. pterostictum* e *C. serrano* apresentaram dois blocos extras conspicuos e adjacentes de ITSs (Figura 2).

Considerando que a análise das relações filogenéticas entre as espécies de *Characidium* ajudariam a inferir a origem evolutiva dos ITSs e do par cromossômico acrocêntrico presente em *C. timbuiense*, *C. serrano* e *C. pterostictum*, um dendrograma molecular foi construído utilizando sequências do DNA mitocondrial dos genes CytB e COI das nove espécies de *Characidium* e da espécie *A. elegans*.

O sequenciamento dos genes gerou uma matriz final com 1,518 caracteres, sendo 481 variáveis e 293 informativos para parcimônia. Não foram detectados nenhum *stop* códon, deleções ou inserções em qualquer uma das sequências. A composição nucleotídica da matriz é de 28.7% de timina, 24.3% de citosina, 29.1% de adenina e 17.9% de guanina. Não foram observadas saturação dos dados, uma vez que o *Iss.c value* foi maior que o *Iss value* (Xia et al. 2003). Além disso, a análise gráfica de transições e transversões em função da distância genética implementado no programa DAMBE também indicou que os dados não estavam saturados ($R^2 = 0.91$ para transições; $R^2 = 0.93$ para transversões). Esta matriz de dados foi usada na análise filogenética seguinte. Os melhores modelos de substituição nucleotídica selecionados para cada partição após a análise do Modeltest estão apresentados na Tabela 2. As topologias geradas pela análise Bayesiana mostraram alta probabilidade posterior para cada nó (>0.91).

A topologia mostrou *C. cf zebra* como a espécie basal na filogenia de *Characidium* e *C. gomesi* e *C. vidali* aparecendo como os próximos ramos do cladograma. Nenhuma destas três espécies apresentaram ITSs em seus cromossomos. Ainda, todas as espécies que apresentaram um par cromossômico acrocêntrico (*C. timbuiense*, *C. serrano* e as duas populações de *C. pterostictum*) também constituíram um grupo monofilético (Figura 3)

Discussão

Neste trabalho, os cariótipos de *C. vidali*, *C. timbuiense* e *C. serrano* foram descritos pela primeira vez e as três espécies apresentaram o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. Além disso, a análise molecular realizada considerando as nove espécies de *Characidium* aqui estudadas evidenciou *C. cf zebra* como o grupo basal no dendrograma de espécies. Notavelmente, esta é a única espécie neste estudo que não apresentou heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. Estes resultados corroboram a hipótese de origem única para o sistema sexual ZZ/ZW neste gênero (Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014).

Independentemente dos cromossomos sexuais, os cariótipos das espécies de *Characidium* são bastante homogêneos, inclusive quanto à sua forma e tamanho. Tal homogeneidade indica que alterações macroestruturais nos cromossomos, como fusão e/ou fissão, não ocorreram durante a história evolutiva deste grupo, embora algumas técnicas sejam necessárias para confirmar esta hipótese (ex: bandamento-G, *cross-species* FISH).

Portanto, a detecção de ITSs em cromossomos de diversas espécies relacionadas e a sua ausência em outras espécies se torna uma característica notável.

Os dados moleculares obtidos indicam que as espécies que não apresentaram ITSs (*C. cf. zebra*, *C. gomesi* e *C. vidali*) não constituem um grupo monofilético. Em contrapartida, todas as outras espécies que apresentaram ITSs formaram um grupo monofilético, sugerindo que a dispersão destes ITSs é uma condição derivada dentro deste gênero. Diversos estudos demonstraram exemplos nos quais os ITSs não estão relacionados com qualquer tipo de rearranjo cromossômico (Pagnozzi et al. 2000, 2002; Nanda et al. 2009). De fato, já foi demonstrado que o DNA telomérico pode estar associado com DNAs satélites, o que poderia explicar sua distribuição em posição intersticial (Adegoke et al. 1993; Garrido-Ramos et al. 1999; Pagnozzi et al. 2000; Metcalfe et al. 2004). Possibilidades adicionais incluem a inserção de repetições (TTAGGG)_n pela telomerase ou até mesmo, a transposição e amplificação destes sítios (Nergadze et al. 2007; Lin & Yan 2008; Ruiz-Herrera et al. 2008). Aqui, considerando algumas características dos ITSs, como *i*) distribuição diferencial entre as diferentes espécies e entre diferentes populações de uma mesma espécie, *ii*) sua localização preferencial em regiões centroméricas e; *iii*) a coincidência destas sequências com regiões heterocromáticas, podemos inferir a ocorrência de uma associação da repetição (TTAGGG)_n com algum tipo DNA satélite para *Characidium*. Este tipo de associação parece ter ocorrido uma única vez na história evolutiva deste grupo de peixes e, provavelmente, ocorreu antes da separação de várias espécies, incluindo *C. pterostictum*, *C. serrano*, *C. schubarti*, *C. timbuiense*, *C. lanei* e *C. lauroi*, seguido de uma evolução independente de cada *cluster* de ITS em cada espécie/população. Considerando o elevado grau de distribuição e diversificação destas sequências, é possível propor que eventos de transposição e/ou de recombinação ectópica podem desempenhar um papel importante na dispersão de *clusters* de ITSs nos cromossomos de *Characidium*. Estes eventos já foram atribuídos como fundamentais na dispersão de sequências repetitivas, como genes ribossômicos e DNAs satélites (Vicari et al. 2008b; Nguyen et al. 2010; Silva et al. 2013; Bueno et al. 2013).

Embora os rearranjos macroestruturais não sejam o principal mecanismo de diversificação cariotípica em *Characidium*, as espécies *C. timbuiense* e *C. serrano* apresentaram um par cromossômico do tipo acrocêntrico, um caractere suposto inicialmente ser restrito a *C. pterostictum* e *C. sp.* (Pansonato-Alves et al. 2010; Pucci et al. 2014). Pansonato-Alves et al. (2010) sugeriram que o surgimento deste par acrocêntrico ocorreu por meio de uma inversão pericêntrica de um par cromossômico submetacêntrico. Com os

resultados observados neste trabalho é possível complementar a hipótese acima, propondo que o surgimento deste par acrocêntrico se deu anteriormente a separação de *C. timbuiense*, *C. pterostictum* e *C. serrano*. Apesar da semelhança, um acúmulo notável e diferencial da heterocromatina neste par cromossômico foi observado apenas nas populações de *C. pterostictum* e *C. serrano*. Embora seja sugerido que uma inversão pericêntrica tenha ocorrido nestes cromossomos acrocêntricos, a presença de ITSs nestes cromossomos específicos não foi observada para nenhuma das espécies analisadas.

A proximidade entre as espécies *C. pterostictum* e *C. timbuiense* já foi sugerida por Buckup & Reis (1997). Entretanto, estes autores não puderam relacionar *C. serrano* com as outras espécies congêneres. Neste trabalho, fornecemos evidências moleculares e citogenéticas para a estreita relação entre estas três espécies. Estas espécies se encontram distribuídas em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, como a bacia do rio Uruguai (*C. serrano*) e complexo de bacias do leste brasileiro (*C. pterostictum* e *C. timbuiense*) (Buckup & Reis 1997); estudos anteriores já mostraram uma estreita relação existente entre estas bacias hidrográficas (Reis et al. 1990; Silva 2004; Lucinda 2005). Além disso, Ribeiro (2006) sugeriu que a estreita relação entre espécies distribuídas ao longo de distinta drenagens nesta área podem ser explicadas por intercâmbios causados pelas reativações tectônicas com falhas da crosta para esta região.

A integralização de abordagens cromossômicas, moleculares e filogenéticas deste estudo permitiu rastrear mudanças cromossômicas particulares, restrita a um grupo específico de espécies de *Characidium* (ex: a origem de um par cromossômico acrocêntrico e o aparecimento e distribuição de ITSs). Devido à variável localização cromossômica encontrada, é possível inferir que os ITSs detectados estejam associados a algum tipo de DNA satélite que, provavelmente, se dispersaram por todo o cariótipo através de eventos mediados por transposição e recombinação ectópica. Portanto, cada *cluster* de ITS/DNA satélite aparenta seguir um caminho evolutivo próprio para cada espécie/população. Em conclusão, os resultados apresentados indicam a ocorrência de alterações genômicas intensas e contínuas entre espécies estreitamente relacionadas de *Characidium*.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Tabela 1. Espécies e populações de *Characidium* analisadas.

Espécies	Coordenadas	Localidade	LBP	N	ITS
<i>C. cf. zebra</i>	S 23°30'40 W 45°51'32	Rio Paraitinga - Salesópolis, SP	8704	3♀ 1♂	-
<i>C. vidali</i>	S 22°28'51.79" W 42°23'39.06"	Córrego Bananeiras - Silva Jardim, RJ	19039	7♀ 2♂	-
<i>C. gomesi</i>	S 23°01'26 W 48°49'32	Rio Novo -Avaré, SP	6377	5♀ 3♂	-
<i>C. pterostictum</i>	S 28°38'43.9"S W 53°33'35.7"	Rio Jacuí - Cruz Alta, RS	14672	7♀ 8♂	12
<i>C. pterostictum</i>	S 29°31'009" W 50°05'37.5"	Lagoa Itapeva, Três Forquilhas, RS	14901	7♀ 2♂	18
<i>C. schubarti</i>	S 25°17'46 W 49°44'56	Rio Cinco Réis - Jaguariaiva, PR	8702	2♀ 1♂	6
<i>C. serrano</i>	S 28°08'01,8" W 55°13'56.9"	Córrego Canoinha - Between São Nicolau and Pirapó, RJ	19038	4♀ 2♂	12
<i>C. timbuiense</i>	S 19°58'32.56" W 40° 32' 53.15"	Córrego Valsugana Velha - Santa Teresa, ES	18475	8♀ 7♂	14
<i>C. lanei</i>	S 25°26'29 W 48°32'28	Cari River - Morretes, PR	8700	1♀ 2♂	8
<i>C. lauroi</i>	S 23°23'42 W45°07'17	Rio Grande - Ubatuba, SP	8741	1♀ 1♂	10

N: Número de espécimes analisadas. ITS: Número cromossômico de marcações teloméricas intersticiais.

Tabela 2. Modelos de substituição nucleotídica para cada partição usada nas análises filogenéticas de cada programa.

Partições	Melhor modelo nucleotídico evolutivo gerado pelo Model Test	Modelo adaptado pelo Mr. Bayes
COI primeira posição de códons	(TrN+G)	Nst=6 Rates=gamma
COI segunda posição de códons	(TrN+G)	Nst=6 Rates=gamma
COI terceira posição de códons	(TrNef+I)	Nst=6 Rates=equal
CytB primeira posição de códons	(TVM+I)	Nst=6 Rates=equal
CytB segunda posição de códons	(GTR+I+G)	Nst=6 Rates=gamma
CytB terceira posição de códons	(K81+I+G)	Nst=6 Rates=gamma

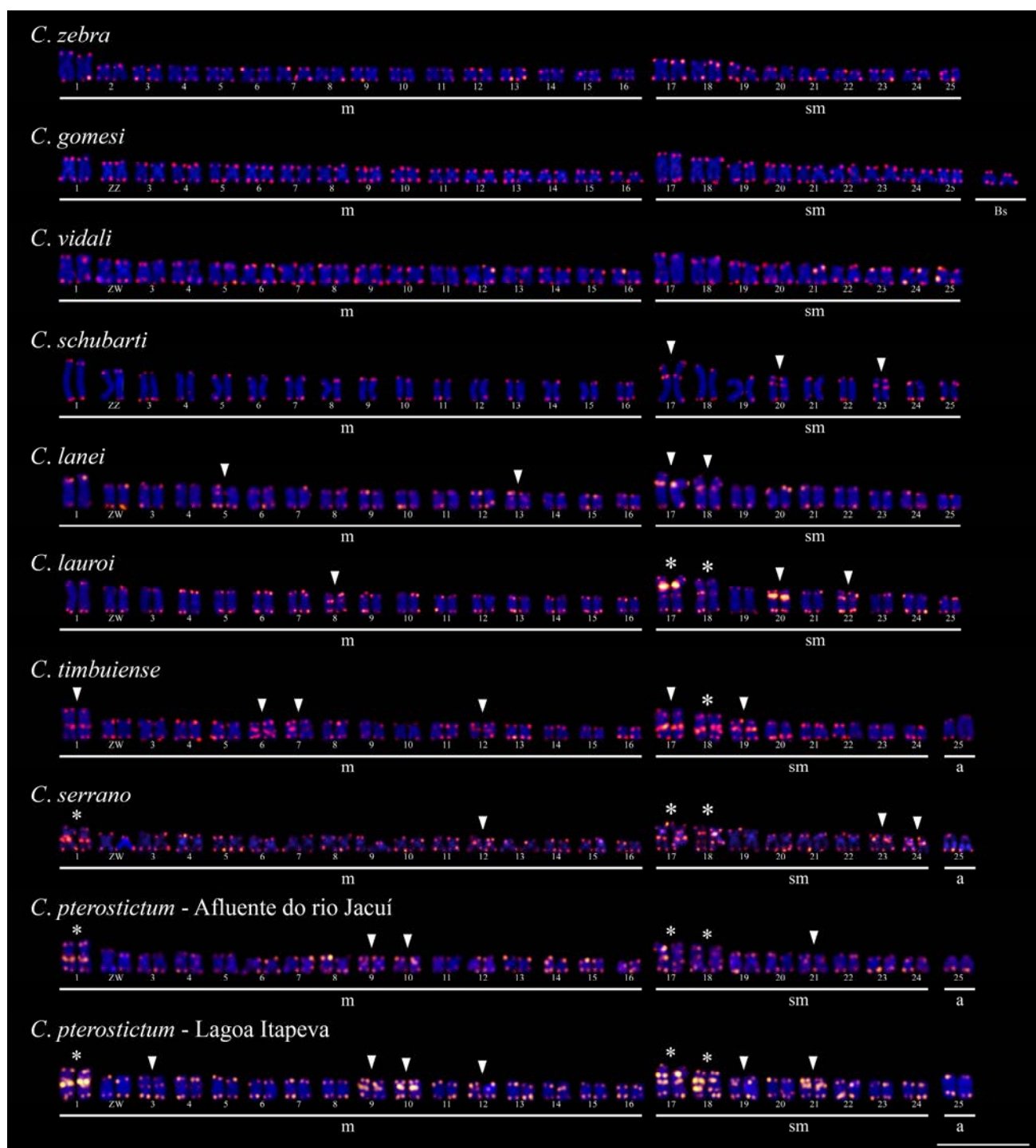


Figura 1: Cariótipos de *Characidium* após a técnica de FISH com a sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n. m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; a= acrocêntrico; Bs= cromossomo B. As setas indicam as marcações de ITs nos cromossomos. Os asteriscos indicam dupla marcação de ITs nos cromossomos. A barra equivale à 10 μm.

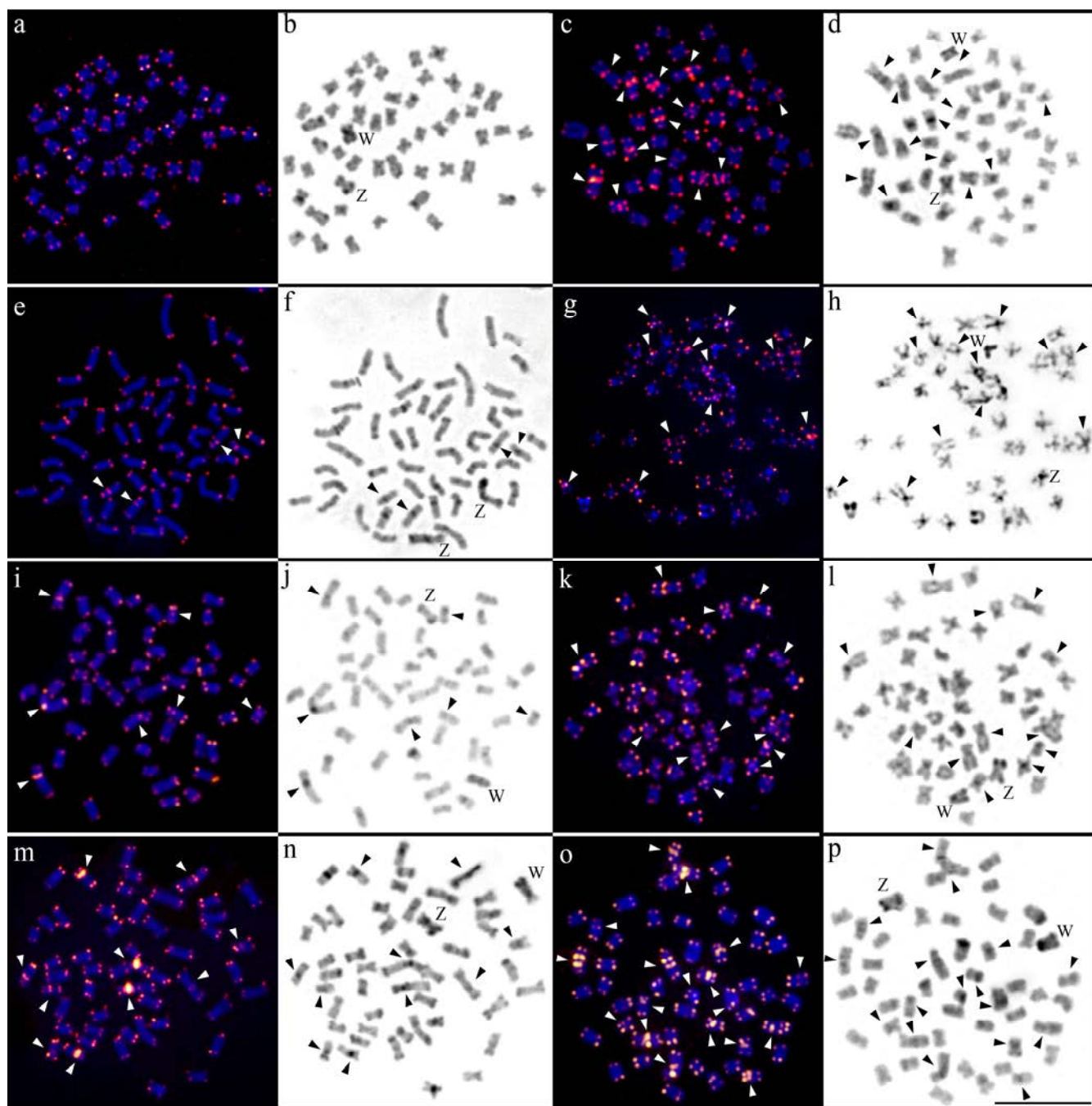


Figura 2: Metáfases de *Characidium* após a técnica de FISH com a sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n e banda C sequencial. (a, b) *C. vidali*, (c, d) *C. timbuiense*, (e, f) *C. schubarti*, (g, h) *C. serrano*, (i, j) *C. lanei*, (k, l) *C. pterostictum* – Rio Jacuí, (m, n) *C. lauroi*, (o, p) *C. pterostictum* – Lagoa Itapeva. As setas indicam os cromossomos com os sítios teloméricos intersticiais. Os cromossomos sexuais Z e W estão em destaque. A barra equivale à 10 µm.

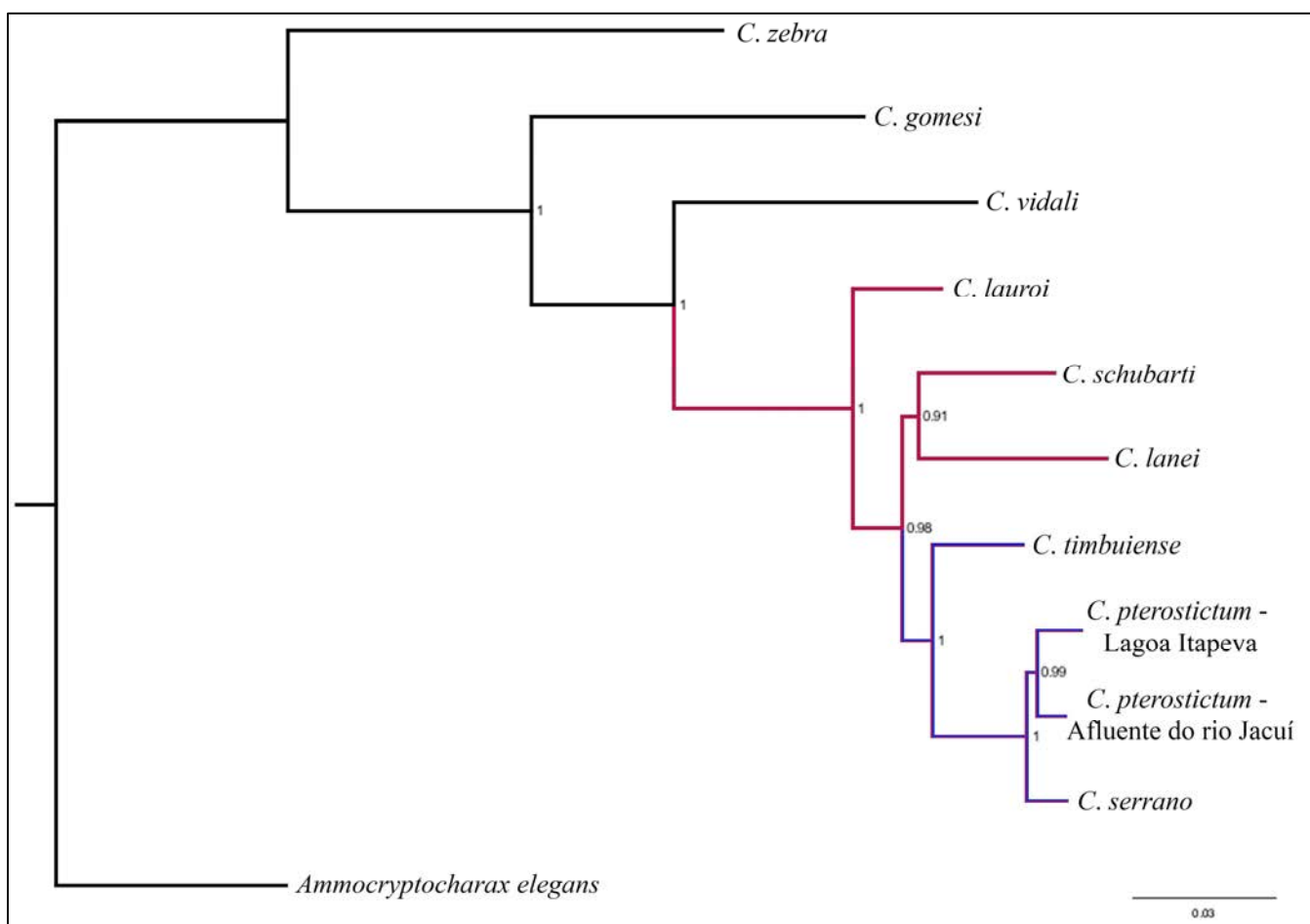


Figura 3: Topologia consenso obtida por análise Bayesiana através do conjunto de dados dos DNAm concatenados. Os valores sobre cada nó representam a probabilidade posterior obtida pela análise Bayesiana. Os clados em vermelho correspondem as espécies que apresentaram marcações de ITSs nos cromossomos; os clados em vermelho e azul representam as espécies que apresentaram que apresentaram marcações de ITSs nos cromossomos + um par cromossômico acrocêntrico.

Capítulo 2

Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *Characidium* (Teleostei: Characiformes): organização genômica e diversificação dos cromossomos sexuais ZW

Resumo

O mapeamento comparativo de sítios ribossômicos de DNAr 18S e 5S e 4 sequências de microssatélites, incluindo (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀, foi realizado em seis espécies de *Characidium*, sendo que cinco delas exibem um sistema heteromórfico de cromossomos sexuais. O mapeamento cromossômico do DNAr 18S evidenciou um único par portador das RONS em todas as espécies. Enquanto nas espécies *C. lanei*, *C. timbuiense* e *C. pterostictum* esse par foi identificado como sendo o cromossomo sexual, em *C. vidali* e *C. gomesi*, os sítios de DNAr 18S estavam localizados em um par autossômico. De forma oposta, o número de cromossomos portadores do DNAr 5S foi variável entre as espécies. Notavelmente, *clusters* deste DNAr foram encontrados no cromossomo W de *C. vidali*, evidenciando pela primeira vez a participação desse sítio ribossômico na diversificação dos cromossomos sexuais deste gênero. As sequências de microssatélites foram encontrados amplamente distribuídos por todos os cromossomos do cariótipo das espécies analisadas, com um acúmulo preferencial nas áreas teloméricas, embora diferenças nítidas em relação à abundância de cada *motif* em cada espécie tenham sido identificadas. Adicionalmente, os cromossomos Z e W mostraram uma distribuição diferencial com relação aos sítios de microssatélites, evidenciando o papel destes segmentos genômicos na diversificação destes cromossomos. No entanto, o acúmulo destas sequências não aparenta estar relacionado com o processo de heterocromatinização, exceto em *C. gomesi*, que apresentou sinais de (TTA)₁₀ espalhados por todo o comprimento do cromossomo W. Os resultados aqui apresentados identificam a contribuição das sequências repetitivas para a diversificação da estrutura e organização do genoma dos peixes, bem como seu papel específico na diversificação dos cromossomos relacionados à determinação de sexo nos organismos pertencentes a este grupo biológico.

Introdução

O genoma dos organismos eucarióticos é geralmente composto por uma quantidade substancial de diferentes tipos de DNA repetitivo, como famílias multigênicas, microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) e elementos transponíveis (TEs), que supõe desempenhar

papel fundamental na organização estrutural dos genomas (López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Microsatélites são repetições *in tandem* de menos de 9 nucleotídeos e estão, geralmente, distribuídos por todo o genoma de animais e plantas (Tautz & Renz 1984; López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Apesar da sua abundância e importância, a distribuição cromossômica destas sequências foi descrita em apenas poucas espécies. Notavelmente, estes poucos estudos evidenciaram que os SSRs podem estar amplamente distribuídos nas regiões eucromáticas, bem como nas heterocromáticas, aparecendo algumas vezes acumuladas em elementos genômicos específicos como nos cromossomos supranumerários e nos sexuais (Lohe et al. 1993; Kubat et al. 2008; Pokorná et al. 2011; Kejnovsky et al. 2013; Milani & Cabral-de-Mello 2014; Ruiz-Ruano et al. 2014).

De forma geral, os cromossomos sexuais representam uma fração pequena de qualquer genoma e são considerados elementos intrigantes, pois apresentam características distintas do complemento autossômico, como composição nucleotídica e taxas de evolução (Mank et al. 2006; Vicoso & Charlesworth 2006; Ellegren 2011). Tais características estão relacionadas com a cessação da recombinação entre os cromossomos homólogos, o que pode resultar em processos de acúmulo de DNA repetitivo e degeneração gênica (Charlesworth 1991). Os peixes são modelos particularmente interessantes para estudos dessa natureza, pois exibem uma ampla variedade de modos de determinação sexual e vários tipos de heteromorfismos cromossômicos relacionados ao sexo, mesmo em espécies relativamente próximas (Bertollo et al. 2000; Mank et al. 2006; Henning et al. 2008). Até o momento, estudos citogenéticos tem permitido uma melhor caracterização destes cromossomos sexuais, como a descrição de distintos graus de heterocromatinização e o acúmulo de sequências repetitivas nestes cromossomos (Parise-Maltempi et al. 2007; Schemberger et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011). A análise de tais informações permitiram determinar a homologia e origem de determinados cromossomos sexuais, estudar seu processo de diferenciação em espécies próximas e até mesmo caracterizar cromossomos sexuais em estágios iniciais de diferenciação (Henning et al. 2008; Vicari et al. 2008; Cioffi & Bertollo 2010; Schemberger et al. 2011).

O gênero *Characidium* compreende cerca de 70 espécies válidas de pequenos peixes amplamente distribuídas pela região Neotropical (Eschmeyer 2015). Particularmente, este grupo pode ser considerado um excelente modelo para estudos de cromossomos sexuais, uma vez que algumas espécies podem mostrar um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW altamente diferenciados, enquanto outras espécies não exibem qualquer heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. Até o presente momento considera-se que os

cromossomos sexuais encontrados em *Characidium* caracterizam-se por apresentarem uma origem única no gênero, sendo o par cromossômico portador das RONS o provável cromossomo *proto-sex* (Vicari et al. 2008; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014). Subsequentemente, eventos distintos como aumento ou redução em tamanho, translocação de sítios de DNAr e eventos de heterocromatinização aparentam guiar a diversificação destes cromossomos sexuais em cada espécie (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014).

Assim, considerando o papel fundamental de sequências repetitivas na diferenciação dos cromossomos sexuais, foi realizado um mapeamento citogenético de genes ribossômicos e 4 sequências de microssatélites nos cromossomos de diferentes espécies de *Characidium*. O objetivo deste estudo foi caracterizar a localização cromossômica de SSRs nos genomas de diferentes espécies deste gênero, comparar a distribuição de DNAs ribossomais e investigar se o processo de heterocromatinização e diferenciação dos cromossomos sexuais estaria diretamente associado com a distribuição de microssatélites nos cromossomos sexuais destas espécies. Os dados aqui obtidos irão contribuir para um melhor entendimento sobre a diversificação de sequências repetitivas no genoma das espécies de *Characidium*, bem como permitir *insights* sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais presentes neste grupo de peixes.

Materiais e Métodos

Material experimental

No presente estudo foram analisadas seis espécies alopátricas de peixes do gênero *Characidium*, incluindo *C. cf. zebra*, *C. gomesi*, *C. lanei*, *C. timbuiense*, *C. vidali* e *C. pterostictum* (Tabela 1). Suspensões celulares de todas as espécies já estavam disponíveis no nosso laboratório e os cariótipos de cada uma das espécies foi caracterizada em trabalhos anteriores (Pansonato-Alves et al. 2010; 2011a, b; Scacchetti et al. 2014). A técnica de bandamento-C foi realizada seguindo procedimentos descritos em Sumner (1972).

Sondas repetitivas e hibridação in situ fluorescente (FISH)

Sondas de oligonucleotídeos contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ foram marcadas com TAMRA durante a sua síntese (Sigma), como descrito em Kubat et al. (2008). Sondas ribossômicas foram obtidas por PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando *primers* descritos anteriormente (White et al. 1990; Pendás et al. 1994). O

DNAr 5S foi marcado com biotina-16-dUTP, enquanto o DNAr 18S foi marcado com digoxigenina-11-dUTP.

Para a microdissecção do cromossomo W foram utilizadas suspensões de células da espécie *Characidium gomesi* (população do ribeirão Alambari, bacia do rio Tietê, Botucatu-SP). As suspensões celulares foram gotejadas em lamínulas de vidro 24 mm x 60 mm e submetidas ao bandamento C para a correta identificação do cromossomo W utilizando, contudo, a metade do tempo de tratamento proposto em Sumner (1972) para resultar em menor degeneração do material cromossômico. A microdissecção foi realizada utilizando-se um micromanipulador com agulha de vidro (5171-Eppendorf), acoplado a um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss). A amplificação do DNA do material microdissecado foi realizada através do Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4 – Sigma) (Gribble et al. 2004). Após a reação, os produtos foram visualizados em gel de agarose e, com o DNA amplificado, foi gerada a sonda do cromossomo W (CgW) a partir de uma reação de reamplificação deste DNA com o Kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit (WGA3 – Sigma). Solução de digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) foi utilizada para marcar a sonda (Pansonato-Alves et al. 2014).

A técnica de FISH foi realizada em 2 exemplares de cada espécie (1 macho e 1 fêmea). Notavelmente, dados de mapeamento de genes ribossômicos das populações analisadas de *C. gomesi* e *C. cf. zebra* já foram descritos em trabalhos anteriores (Pansonato-Alves et al. 2011a, b). As condições de pré-hibridação foram as mesmas para todas as amostras analisadas e seguiram os procedimentos descritos em Pinkel et al. (1986). As lâminas foram incubadas em RNase (50ug/ml) por 1h a 37°C e, então, o DNA cromossômico foi denaturado em formamida 70%/2xSSC por 4min a 70°C. Para cada lâmina, 30ul de solução de hibridação contendo 200ng da sonda marcada, 50% de formamida, 2xSSC e 10% de sulfato dextrano foi desnaturada a 95°C por 10min, colocada sobre as lâminas utilizando uma lamínula e hibridada *overnight* em uma câmara úmida. Pós-hibridação, diferentes lavagens foram aplicadas, a depender da sonda utilizada: i) as lâminas com sondas de DNAr 5S e 18S e CgW foram lavadas em 0.2xSSC/15% de formamida por 20min a 42°C, seguidos por uma lavagem em 0.1xSSC por 15min a 60°C e uma lavagem final em temperatura ambiente em 4xSSC/0.5% Tween por 10min. A detecção das sondas foi realizada com anti-digoxigenina-rodamina e avidina-FITC; ii) as lâminas com as sondas de microssatélites foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos, seguido por uma lavagem em PBS 1X por 1min. Posteriormente, os cromossomos foram contracorados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

Resultados

De forma geral, os experimentos de FISH utilizando as sondas (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ mostraram um mesmo padrão de distribuição destas sequências nos autossomos, com um acúmulo preferencial em regiões teloméricas, exceto para o *motif* (CG)₁₅ em *C. timbuiense* e *C. cf. zebra*, que, aparentemente, está restrito a um único par ou único cromossomo (Figura 1). Os cromossomos supranumerários de *C. gomesi* não apresentaram nenhum tipo de acúmulo preferencial, exceto para os *motifs* (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ que se apresentaram nas regiões teloméricas destes cromossomos (Figura 1).

Todas as espécies analisadas mostraram um esperado número diploide de 2n=50 cromossomos, principalmente compostos por cromossomos de dois braços, exceto as espécies *C. timbuiense* e *C. pterostictum*, que apresentaram 1 par de acrocêntricos cada como descritos em Scacchetti et al. (2014) e *C. gomesi* que apresentou uma variação de 1-3 cromossomos Bs (Maistro et al. 1998, onde chamaram *C. gomesi* de *C. fasciatum*). A técnica de bandamento-C evidenciou marcações centroméricas em todas as espécies e os cromossomos sexuais, exceto em *C. cf. zebra* (Figura 2).

A aplicação da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S revelou sinais em posição terminal dos cromossomos Z e W de *C. timbuiense*, *C. lanei* e *C. pterostictum*, enquanto em *C. vidali* estes sítios estão em um par autossômico (Figura 2). Sinais de hibridação da sonda de DNAr 5S foram observados em 1 par autossômico de *C. lanei*, 3 pares em *C. pterostictum* e *C. timbuiense*. Em *C. vidali*, sinais foram detectados em 1 par autossômico e no cromossomo W (Figura 2).

A pintura cromossômica com sondas obtidas a partir de cromossomos W microdissecados (CgW) de *C. gomesi* (população do ribeirão Alambari, bacia do rio Tietê, Botucatu-SP) em preparações de cromossomos metafásicos de *C. gomesi* (população do Vêu de Noiva, bacia do rio Paranapanema, Botucatu-SP) resultou em completa marcação no cromossomo W e sinais de hibridação na região pericentromérica do cromossomo Z (Figura 4). Em *C. lanei* e *C. pterostictum* a sonda marcou, principalmente, todo o braço longo do cromossomo W e a região pericentromérica do cromossomo Z (Figura 3). Já *C. timbuiense* a sonda marcou praticamente todo o cromossomo W e a região centromérica e peritelomérica do cromossomo Z (Figura 3). Por fim, os cromossomos sexuais de *C. vidali* apresentaram marcações, principalmente, em todo o braço longo do cromossomo W e nas regiões pericentromérica e peritelomérica do cromossomo Z (Figura 3).

Em relação à distribuição de SSRs nos cromossomos sexuais, padrões específicos foram observados para os cromossomos Z e W de cada espécie. Adicionalmente, nenhuma das sondas gerou um padrão similar em ambos os cromossomos sexuais de uma mesma espécie. Os microssatélites foram localizados tanto nas regiões eucromáticas como nas heterocromáticas dos cromossomos sexuais, incluindo regiões teloméricas e intersticiais. Notavelmente, o cromossomo W de *C. gomesi* mostrou um acúmulo intenso do *motif* (TTA)₁₀ praticamente em todo o seu comprimento (Figura 4). Vale ressaltar que os cromossomos sexuais mostraram diferentes graus de heterocromatinização. Assim, o cromossomo W de *C. gomesi* era quase totalmente heterocromático, enquanto o W de todas as outras espécies apresentaram um grau de heterocromatinização intermediário (Figura 4).

Discussão

Distribuição de DNA repetitivo nos autossomos

O presente estudo forneceu a primeira caracterização da distribuição cromossômica de *motifs* de microssatélites em *Characidium*. Em geral, tanto di- quanto tri-nucleotídeos estão ampla e similarmente distribuídos pelos genomas das espécies analisadas, com um acúmulo preferencial nas regiões teloméricas. De fato, alguns estudos relatam que o acúmulo de microssatélites em genomas eucarióticos não é randômico e que cada grupo de organismos/espécies aparenta mostrar um acúmulo preferencial de *motifs* específicos com uma distribuição cromossômica particular (Tóth et al. 2000; Ruiz-Ruano et al. 2014). Notavelmente, os SSRs (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CG)₁₅ já foram mapeados em diferentes espécies de peixes Characiformes e mostraram uma distribuição telomérica semelhante em 5 espécies de gêneros distintos (*Hoplias*, *Leporinus* e *Triportheus*), enquanto 2 espécies de *Semaprochilodus* mostraram poucos sinais teloméricos e centroméricos (Cioffi et al. 2011, 2012; Poltronieri et al. 2014; Terencio et al. 2013; Yano et al. 2014). Em contraste, distintas espécies de gafanhotos apresentam um notável espalhamento de vários SSRs por quase todo o genoma (Cuadrado & Jouve 2010; Milani & Cabral-de-Mello 2014; Ruiz-Ruano et al. 2014).

Embora exista uma clara tendência de acúmulo de SSRs em áreas teloméricas em *Characidium*, deve-se destacar que a distribuição e acúmulo de microssatélites nos autossomos são bastante suscetíveis à mudanças no nível interespecífico e até mesmo no nível intra-genômico. Neste sentido, verifica-se que o *motif* (CG)₁₅ está acumulado em regiões teloméricas de quase todos os cromossomos de *C. gomesi*, *C. lanei*, *C. pterostictum* e *C.*

vidali, enquanto em *C. timbuiense* e *C. cf. zebra* os sinais estão restritos a um ou dois cromossomos (Figura 1).

Estudos prévios utilizando dados citogenéticos, moleculares e morfológicos mostraram que *C. zebra* é uma espécie basal na filogenia de *Characidium*, enquanto *C. timbuiense* é uma espécie intimamente relacionada a *C. pterostictum* (Buckup 1993; Vicari et al. 2008; Pansonato Alves et al. 2014, Scacchetti et al. 2014). Assim, nós sugerimos que esse SSR específico foi provavelmente eliminado dos genomas de ambas as espécies, revelando que a distribuição cromossômica de microssatélites em *Characidium* não parece refletir a história evolutiva dos táxons. Adicionalmente, claras diferenças na abundância de SSRs entre distintos cromossomos de um mesmo indivíduo puderam ser notadas. Tais resultados corroboram com a ideia de que a organização genômica de cada SSR parece ser governada por distintos mecanismos moleculares, como recombinação ectópica, *crossing-over* desigual, deslizamento (*slippage*) da DNA Polimerase e associação com TEs. Juntos, assume-se que todos estes mecanismos controlam a expansão, acúmulo e eliminação destas sequências em diferentes níveis de resolução, seja interespecífica, interpopulacional e/ou intra genômica (Dover 1993; McMurray 1995; Hancock 1996, Milani & Cabral-de-Mello 2014; Ruiz-Ruano et al. 2014).

No presente estudo também é apresentada a localização genômica dos DNAs ribossômicos 5S e 18S nas espécies *C. vidali*, *C. timbuiense* e *C. lanei*. Os resultados obtidos estão de acordo com os padrões geral de distribuição cromossômica de genes ribossomais neste gênero, com dois *clusters* por genoma para as sequências de DNAr 18S e variável em número para *clusters* de sequências de DNAr 5S. Tal padrão tem sido descrito para várias espécies de *Characidium* e tal dinâmica particular é atribuída à associação dos genes ribossomais com elementos transponíveis (Pucci et al. 2014), como é suposto ocorrer em várias outras espécies de peixes (da Silva et al. 2011; Silva et al. 2013).

Cromossomos sexuais

Os resultados de pintura cromossômica corroboram a hipótese de que os cromossomos sexuais Z e W de *Characidium* são homeólogos nas diferentes espécies analisadas (Machado et al. 2011, Pazian et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014). Apesar desta homeologia, a diversificação dos cromossomos Z e W em diferentes espécies é notável. Os dados do presente trabalho adicionam novos *insights* sobre este tópico e evidenciam, pela

primeira vez, o papel do DNAr 5S e das sequências de microssatélites na diversificação dos cromossomos sexuais das espécies componentes deste gênero.

Estudos anteriores evidenciaram que a presença de sítios de DNAr 18S nos cromossomos sexuais de *Characidium* implicaria em um estado intermediário de heterocromatinização do cromossomo W. No entanto, se as RONS passaram por um evento de translocação para os autossomos, o cromossomo W poderia apresentar um grau intenso de heterocromatinização (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Tal característica é baseada na premissa de que cromossomos sexuais portadores das RONS poderiam trocar segmentos cromossômicos naquela região, reduzindo assim as taxas evolutivas de diferenciação entre eles. Consequentemente, nos casos em que os cromossomos Z e W não apresentam RONS, seria observada uma diminuição das taxas de recombinação entre estes cromossomos, o que, consequentemente, favoreceria a sua diferenciação, evidenciando-se por exemplo, o processo de heterocromatinização (Pansonato-Alves et al. 2011). Nossos resultados corroboram parcialmente com esta hipótese para a maioria das espécies deste gênero, com exceção de *C. vidali* que exibiu os cromossomos Z e W em estágios intermediários de heterocromatinização, embora eles não apresentem sítios de DNAr 18S. Curiosamente, o cromossomo W desta espécie também apresenta um *cluster* exclusivo de DNAr 5S, o que poderia atuar também para diminuir ainda mais a frequência de recombinação entre os cromossomos heteromórficos. Nesse contexto, poderia ser proposto que a translocação das RONS em *C. vidali* pode ter ocorrido mais recentemente do que em *C. gomesi* e os cromossomos sexuais desta espécie ainda estariam em um estágio intermediário de diferenciação.

Os resultados do mapeamento e análise do comportamento genômico das sequências SSR mostraram que cada sequência exibiu distintas características de acúmulo em cada uma das espécies. Por exemplo, alguns *motifs* foram mais abundantes nos cromossomos Z, apontando para uma possível perda de sequências repetitivas no cromossomo W, enquanto outros *motifs* mostraram-se exclusivamente agrupados no cromossomo W, como o (CG)₁₅ em *C. timbuiense*. Nesse sentido, pode ser sugerido que em algum período específico um microssatélite particular poderia se fixar e se expandir nos cromossomos sexuais devido à sua natureza não recombinante. A falta de correspondência entre os SSR acumulados nos cromossomos sexuais de distintas espécies provavelmente reflete uma contingência histórica, como proposto por Pokorná et al. (2011). Em todos estes casos, é certo que a distribuição diferencial de SSR pode contribuir para a diminuição da frequência de recombinação entre os

cromossomos Z e W e, conseqüentemente, desempenhar um papel importante no processo de diferenciação destes cromossomos.

O mapeamento cromossômico dos SSRs revelou que estes segmentos genômicos foram localizados diferencialmente quando comparados os cromossomos Z e W de diversas espécies, confirmando a sua natureza heteromórfica. De forma geral, não foi possível observar um acúmulo preferencial de microssatélites nos cromossomos W, com exceção de *C. gomesi*. Esta espécie foi a única que apresentou um acúmulo conspícuo do motif (TTA)₁₀ ao longo deste cromossomo, tanto no braço longo quanto no braço curto (Figura 4). Coincidentemente, esta também é a única espécie relacionada neste estudo que apresentou um cromossomo W totalmente heterocromático, sugerindo uma associação entre os processos de heterocromatinização e acúmulo de (TTA)₁₀. Em concordância com este resultado, vários estudos têm revelado um maior acúmulo de SSRs nas áreas heterocromáticas do cromossomo sexo-específico (Pokorná et al. 2011; Cioffi et al. 2012; Poltronieri et al. 2013; Terencio et al. 2013; Yano et al. 2014). Contudo, também deve ser destacado que as demais sequências SSRs mapeadas nas espécies aqui estudadas mostraram-se presentes tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas nos cromossomos sexuais, indicando que elas não estariam necessariamente associadas com processos de acúmulo de heterocromatina.

No presente estudo ficou evidente uma grande diversidade na distribuição das sequências SSR nos cromossomos de diferentes espécies de *Characidium*, fornecendo novas evidências sobre a ocorrência de mudanças genômicas intensas e contínuas neste grupo. Além disso, os dados também evidenciam informações adicionais de interesse sobre a localização, distribuição e possível papel de sequências repetitivas na evolução dos cromossomos sexuais de *Characidium*. Finalmente, os resultados parecem suportar a hipótese de que eventos randômicos específicos e frequentemente não relacionados às características intrínsecas de uma sequência em particular parecem desempenhar papel fundamental na determinação da sequência SSR que irá se acumular nos cromossomos de cada uma das espécies.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Tabela 1: Espécies e populações de *Characidum* analisadas

Espécies	Coordenadas	Localidade	LBP	N
<i>C. cf. zebra</i>	S 23°30'40 W 45°51'32	Rio Paraitinga - Salesópolis, SP	8704	3♀ 1♂
<i>C. vidali</i>	S 22°28'51.79" W 42°23'39.06"	Córrego Bananeiras - Silva Jardim, RJ	19039	7♀ 2♂
<i>C. gomesi</i>	S 23°01'26 W 48°49'32	Rio Novo - Avaré, SP	6377	5♀ 3♂
<i>C. gomesi</i>	S 23°01'26 W 48°49'32	Cachoeira Véu da Noiva – Botucatu, SP	16908	3♀ 2♂
<i>C. pterostictum</i>	S 28°38'43.9"S W 53°33'35.7"	Rio Jacuí - Cruz Alta, RS	14672	7♀ 8♂
<i>C. timbuiense</i>	S 19°58'32.56" W 40°32'53.15"	Córrego Valsugana Velha - Santa Teresa, ES	18475	8♀ 7♂
<i>C. lanei</i>	S 25°26'29 W 48°32'28	Rio Cari - Morretes, PR	8700	1♀ 2♂

N: Número de indivíduos analisados.

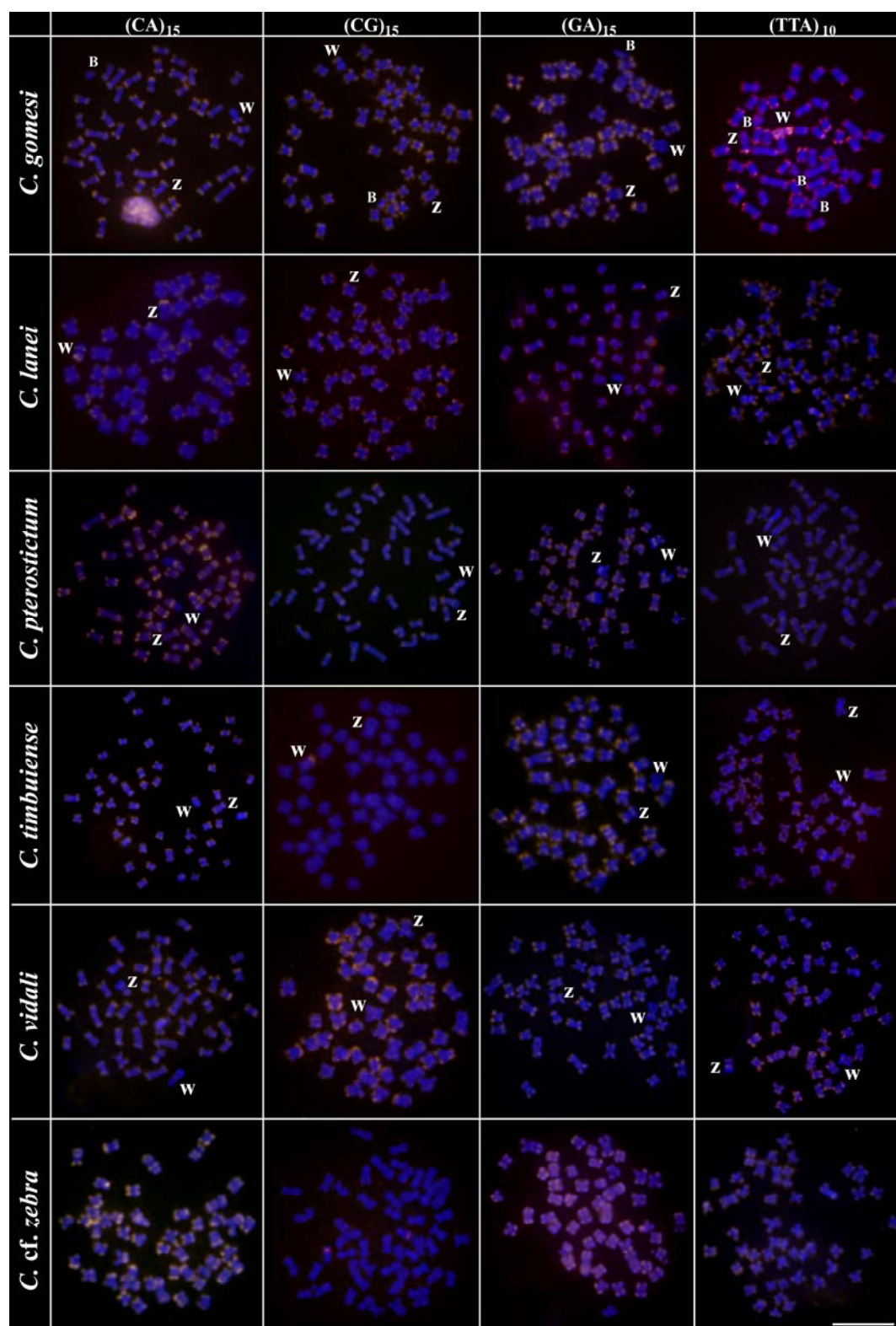


Figura 1: Metáfases somáticas de fêmeas de seis diferentes espécies de *Characidium* após hibridação com sondas de oligonucleotídeos contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅, e (TTA)₁₀ marcados com TAMRA (Sigma). As letras destacam os cromossomos sexuais e os cromossomos Bs. A barra equivale a 10 µm.

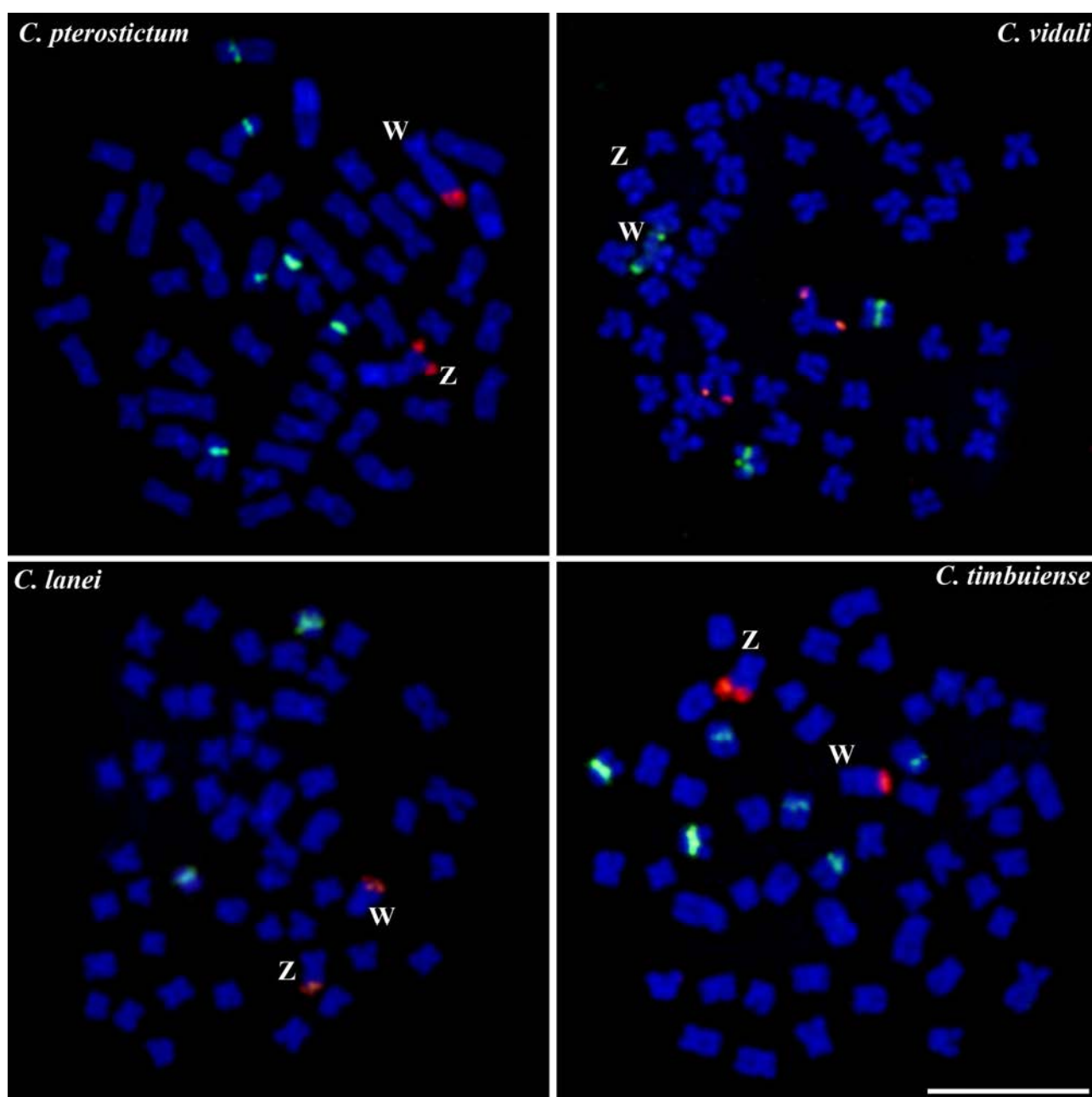


Figura 2: Metáfases somáticas de fêmeas de quatro diferentes espécies de *Characidium* após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). As letras destacam os cromossomos sexuais. A barra equivale a 10 μ m.

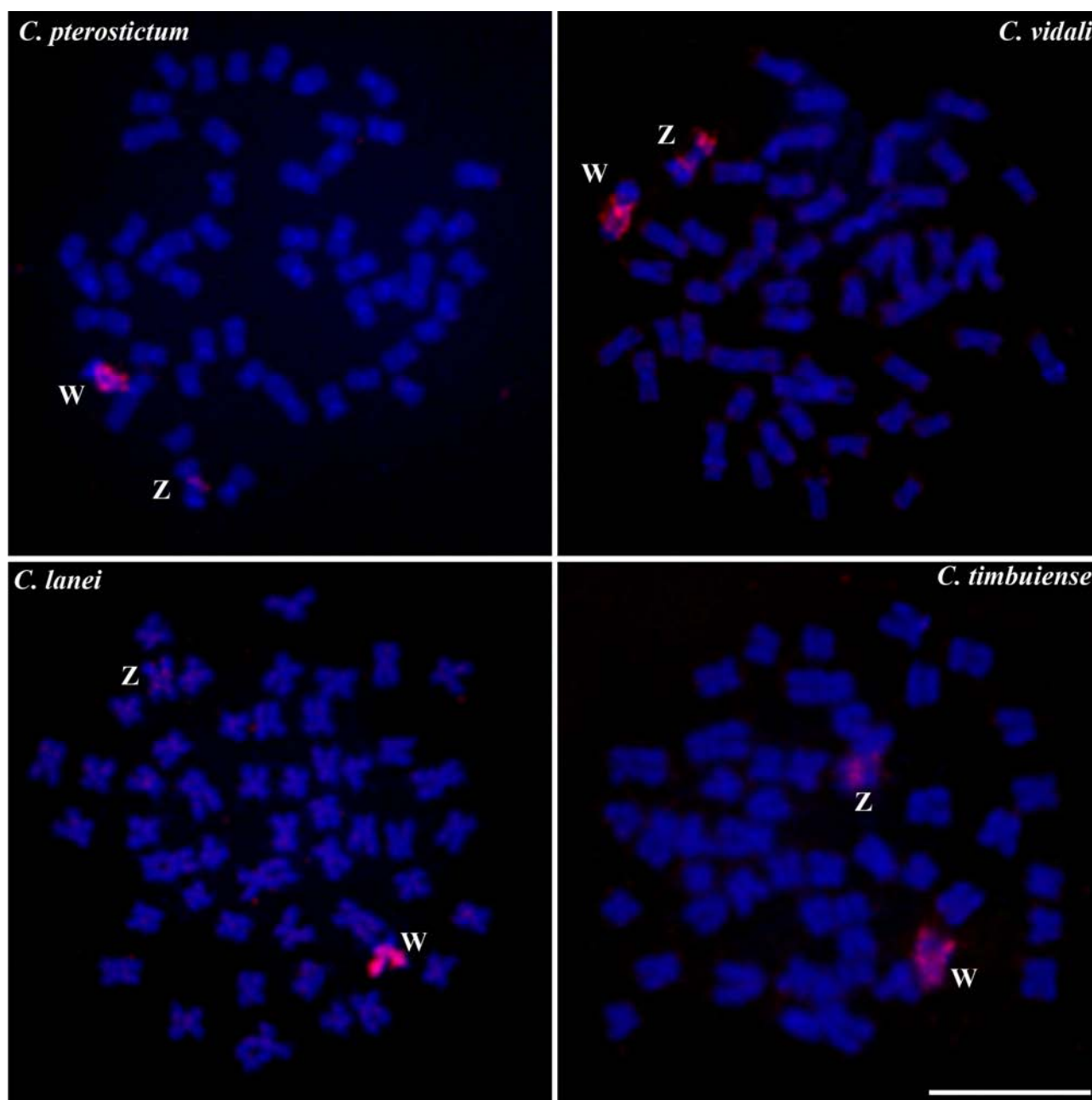


Figura 3: Metáfases somáticas de fêmeas de quatro diferentes espécies de *Characidium* após hibridação com a sonda CgW. As letras destacam os cromossomos sexuais. A barra equivale a 10 μm .

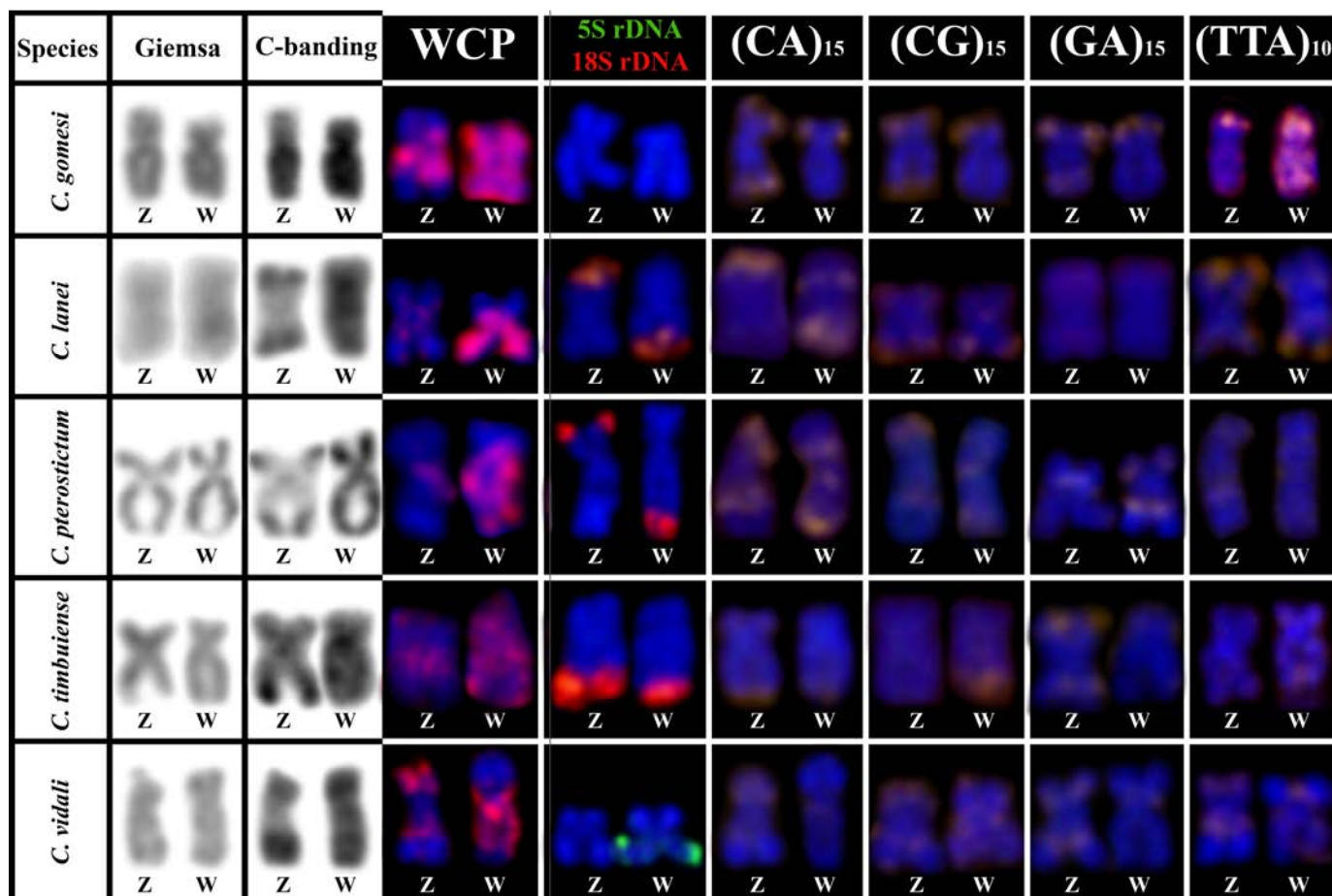


Figura 4: Cromossomos sexuais Z e W das espécies de *Characidium* analisadas no presente trabalho submetidos à coloração convencional com Giemsa; bandamento C; hibridação com a sonda total para o cromossomo W (CgW); hibridação com a sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde); e hibridação com sondas de oligonucleotídeos contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (CG)₁₅ (GA)₁₅, e (TTA)₁₀ marcados com TAMRA (Sigma).

Capítulo 3

Diversidade cariotípica e evolução dos cromossomos sexuais ZZ/ZW em espécies do gênero *Characidium* (Teleostei: Characiformes): mapeamento de DNAs repetitivos e pintura do cromossomo W

Resumo

No presente estudo foram analisadas quatorze espécies de peixes do gênero *Characidium* coletadas em diferentes bacias hidrográficas brasileiras com o uso de técnicas citogenéticas clássicas que compreendem a coloração convencional com Giemsa e bandamento C e técnicas moleculares de hibridação *in situ* fluorescente - FISH com sondas de DNAr 5S e 18S e snDNA U2, além de uma sonda produzida a partir do cromossomo W de *Characidium gomesi* denominada CgW, obtida por microdissecção cromossômica. Todas as espécies analisadas apresentaram número diploide conservado de 50 cromossomos, com predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Além disso, a espécie *Characidium* sp. aff. *C. vidali* apresentou uma variação de 1-4 cromossomos supranumerários. Em todas as espécies, exceto *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmatosum*, foram constatadas a ocorrência de um sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais em distintos estágios de diferenciação. Nas espécies que apresentaram cromossomos sexuais, foram detectados blocos de heterocromatina constitutiva, localizados principalmente no cromossomo W e em blocos intersticiais e/ou teloméricos nos braços longos do cromossomo Z. O DNAr 18S apresentou-se conservado em número de sítios por genoma, apresentando, contudo, variações quanto à sua localização, enquanto o DNAr 5S apresentou variações quanto à sua localização e distribuição entre as espécies. De forma oposta, os sítios de snDNA U2 estão distribuídos de forma conservada nas espécies analisadas, com marcações apenas no primeiro par cromossômico, exceto em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *Characidium* sp2 que apresentaram as marcações no primeiro par submetacêntrico. A sonda CgW marcou os cromossomos W de quase todas as espécies analisadas e regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos Z, bem como toda extensão dos cromossomos Bs de *Characidium* sp. aff. *C. vidali*. Os resultados apresentados refletem a grande diversificação microestrutural do cariótipo que determinaram a diversificação existente no genoma deste grupo de peixes, independentemente da homogeneidade macroestrutural cariotípica existente, bem como contribuem para uma melhor identificação das relações existentes entre os seus componentes.

Introdução

O gênero *Characidium* constitui um grupo especioso de peixes inserido na família Crenuchidae e está amplamente distribuído na região Neotropical (Buckup & Reis 2003). Este grupo é um dos mais ricos em espécies dentro da ordem dos Characiformes com aproximadamente 70 espécies válidas (Eschmeyer 2015). No entanto, a taxonomia deste grupo ainda é controversa, sendo que várias espécies foram descritas nos últimos anos (revisão em Leitão & Buckup 2014).

Dados citogenéticos obtidos para diferentes espécies de *Characidium* revelaram que todos os representantes deste gênero apresentam um número diploide conservado de 50 cromossomos. No entanto, estudos realizados em diferentes espécies/populações evidenciam mudanças genômicas contínuas nos representantes deste gênero, como o surgimento de cromossomos acrocêntricos em algumas espécies, de cromossomos sexuais em diferentes estágios de evolução, distribuição diferencial de diversos tipos de DNA repetitivo e o surgimento independente de cromossomos B entre os componentes deste grupo (Miyazawa & Galetti Jr. 1994; Centofante et al. 2001, 2003; Maistro et al. 2004; Vicari et al. 2008; Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011, 2014; Pazian et al. 2013; Pucci et al. 2014; Scacchetti et al. 2014; Capítulo 2). Tais características evidenciam a grande variabilidade existente na estrutura cromossômica dos representantes deste gênero em um nível sub-cromossômico de resolução.

Embora seja considerado um excelente modelo para estudos cariotípicos, apenas 17 espécies deste grupo tiveram seus cariótipos estudados até o presente. Além disso, destaca-se a maior concentração de espécies analisadas na região Sul/Sudeste do Brasil, notavelmente nos componentes das bacias Hidrográficas do Alto rio Paraná e bacias Costeiras do Leste brasileiro, com poucos representantes de outras bacias hidrográficas com cariótipo conhecido (revisão em Pucci et al. 2014, Scacchetti et al. 2014). Diante do exposto, no presente trabalho reporta os resultados da análise dos cariótipos de 14 espécies distintas de *Characidium* utilizando ferramentas citogenéticas clássicas e moleculares, envolvendo a aplicação da técnica de coloração convencional com Giemsa, bandamento-C, mapeamento cromossômico de snDNA U2 e genes ribossômicos 5S e 18S, além da pintura cromossômica utilizando uma sonda W-específica. Tais resultados foram comparados com dados da literatura e forneceram uma melhor compreensão da diversidade cariotípica geral existente, incluindo informações

sobre a distribuição de sequências de DNAs repetitivos, ampliando o conhecimento sobre a ocorrência de cromossomos sexuais e supranumerários neste grupo.

Materiais e Métodos

No presente estudo, quatorze espécies do gênero *Characidium* capturadas em diferentes bacias hidrográficas brasileiras foram analisadas citogeneticamente, estando as informações gerais apresentada na Tabela 1. Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 1).

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido da região anterior do rim dos exemplares, de acordo com protocolo utilizado por Foresti et al. (1981) com algumas adaptações. O bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito em Sumner (1972). Na organização dos cariótipos, os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) segundo Levan et al. (1964) e arranjados em ordem decrescente de tamanho.

Para a produção das sondas de DNAr 5S e 18S e snDNA U2, foi utilizado o DNA genômico de *C. pterostictum*, extraído através do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) segundo instruções do fabricante. A sonda do cromossomo W foi obtida por microdissecção de *C. gomesi* proveniente da população do ribeirão Alambari, bacia do rio Tietê, Botucatu-SP e foi chamada de CgW (Capítulo 2). Esta mesma sonda já foi utilizada por Pansonato-Alves et al. (2014). As sondas de DNAr 18S, snDNA U2 e CgW foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina enquanto a sonda de DNAr 5S foi marcada com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando avidina-fluoresceína conjugada (FITC).

O mapeamento dos sítios de DNAr 5S e 18S, snDNA U2 e a pintura com a sonda CgW nos cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986). Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 softwares (MediaCybernetics).

Resultados

Todas as espécies analisadas no presente trabalho apresentaram número diploide conservado de 50 cromossomos, compostos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figuras 1, 2 e 3). Além disso, todos os exemplares de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* apresentaram uma variação intrapopulacional de 1-4 cromossomos Bs heterocromáticos por célula (Figura 3). O bandamento C evidenciou marcações centroméricas em todos os cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW para a maioria das espécies, exceto em *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmosum* (Figuras 1, 2 e 3).

O mapeamento das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) pela aplicação da técnica de FISH utilizando sonda de DNAr 18S revelou marcações fluorescentes em um único par cromossômico para todas as espécies analisadas, porém com variação na localização entre elas, sendo detectada no par 23 para as espécies *C. cf. zebra*, *C. tenue* e *C. xavante* e *C. stigmosum* (Figura 1); no primeiro par em *Characidium* sp4 (Figura 2); no par 7 para *Characidium* sp1 e *Characidium* sp5 (Figura 2); no par 19 para *Characidium* sp6 e no par 21 para *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Figuras 3). Todas as demais espécies apresentaram as RONs alocadas em ambos cromossomos sexuais (Figura 6), exceto *Characidium* sp3, que apresentou marcações em um dos homólogos do par 7 e apenas no cromossomo W (Figura 2).

O DNAr 5S apresentou resultados diversos, mostrando uma variação significativa no número e na localização dos *clusters*. Estes sítios foram detectados em um par cromossômico nas espécies *Characidium* sp., *Characidium* sp2, *Characidium* sp3, *Characidium* sp4, *Characidium* sp5 (Figura 2, em verde), em dois pares em *C. cf. zebra*, *C. tenue* (Figura 1, em verde), em três pares em *C. xavante*, *C. stigmosum*, *C. vestigipinne*, *Characidium* sp6 e *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Figuras 1 e 3, em verde) e em cinco pares em *C. rachovii* e *C. orientale* (Figura 3, em verde).

A distribuição dos *clusters* do gene U2 foi mostrou-se altamente conservada, marcando de modo frequente o primeiro par metacêntrico na maioria das espécies analisadas, com exceção de *Characidium* sp. aff. *C. vidali* e *Characidium* sp2 que apresentaram marcações no primeiro par subtelocêntrico (Figuras 1, 2 e 3 – box).

A sonda CgW apresentou sinais de hibridação nos cromossomos W de quase todas as espécies analisadas, indicando o compartilhamento de sequências entre estes cromossomos nas diferentes espécies (Figura 4). Notavelmente, esta sonda não mostrou sinais conspícuos nos cromossomos W das espécies *Characidium* sp1 e *Characidium* sp3 (Figura 6), sendo

observados apenas sinais centroméricos. Finalmente, a hibridação com esta sonda sobre espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos gerou marcações do tipo dispersas, na forma de pequenos *clusters* em vários cromossomos do complemento (Figura 5).

Discussão

Diferenciação cromossômica em Characidium

De todas as espécies analisadas no presente estudo, apenas *C. cf. zebra* já tinha seu cariótipo conhecido, enquanto as demais *Characidium vestigipinne*, *C. rachovii*, *C. orientale*, *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, *C. tenue*, *C. xavante* e 6 espécies ainda sem identificação definitiva foram analisadas citogeneticamente pela primeira vez, aumentando o número de espécies cariotipadas do gênero para 30 (Tabela 2). As análises cariotípicas confirmaram a existência de um estado expressivo de conservação do número diploide cromossômico nas espécies deste grupo, identificada em trabalhos anteriores. Contudo, a ocorrência de cromossomos sexuais em diferentes estágios de diferenciação (Centofante et al. 2001 e 2003; Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pazian et al. 2013; Pucci et al. 2014; Capítulo 2; presente estudo); a presença de cromossomos supranumerários (Miyazawa & Galetti, 1994; Maistro et al. 2004; Pansonato-Alves et al. 2010, 2014; presente estudo) parecem se antepor à homogeneidade numérica e demonstrar certa variabilidade da macroestrutura cromossômica entre os representantes do grupo. Por outro lado, a distribuição diferencial de distintos tipos de DNA repetitivo nos cromossomas das espécies (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2011; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014; Capítulo 2; presente estudo) aparecem como sinais efetivos de grande diversificação microestrutural no genoma dos representantes deste gênero.

Estudos anteriores evidenciaram a ocorrência de cromossomos supranumerários em populações específicas de determinadas espécies de *Characidium*, como *C. pterostictum*, *C. oiticica*, *C. gomesi* e *C. cf. zebra* (Miyazawa & Galetti Jr. 1994; Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011, 2014). Notavelmente, Pansonato-Alves et al. (2014) destacaram que, embora alguns destes cromossomos Bs compartilhem sequências, tais como os elementos supranumerários identificados em *C. pterostictum* e *C. gomesi*, todos eles tiveram uma origem independente em suas respectivas linhagens. Nesse sentido, o compartilhamento das sequências seria explicado pelo fato destes cromossomos Bs terem surgido em ambas as linhagens a partir de cromossomos semelhantes, os cromossomos sexuais. No presente trabalho, é descrito um novo caso de cromossomos Bs heterocromáticos

ocorrendo na espécie *Characidium* sp. aff. *C. vidali*, adicionando novos dados da ocorrência destes elementos no gênero. Curiosamente, assim como ocorre em *C. pterostictum* e *C. gomesi*, os cromossomos Bs desta espécie compartilham sequências com o cromossomo W, sugerindo ser este também seu cromossomo de origem. Uma vez que *Characidium* sp. aff. *C. vidali* não aparenta ser uma espécie proximamente relacionada a *C. pterostictum* e *C. gomesi* (Leitão & Buckup 2014), propõe-se que os cromossomos Bs desta espécie também tenham surgido de forma independente. Visto que os cromossomos sexuais em *Characidium* estão sujeitos à elevadas taxas de rearranjos e modificações estruturais (Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014; Capítulo 2), pode ser sugerido que os elementos supranumerários destas três espécies poderiam ter se originado como subprodutos destes rearranjos genômicos e se fixados nas diferentes espécies e populações.

O mapeamento citogenético de diferentes DNAs repetitivos evidenciou características distintas para cada sequência. Foi possível verificar que ambos os sítios ribossomais se distribuem de forma variável nas distintas espécies analisadas. Assim, o DNAr 18S se mostrou-se conservado em número de *clusters* presente nos cromossomos (2 *loci* por genoma), enquanto o DNAr 5S mostrou-se bastante diversificado, com variações de 2 a 10 sítios presentes por genoma. De fato, estudos anteriores evidenciaram a ocorrência de variações na distribuição de genes ribossomais, revelando que, possivelmente, estes sítios estejam associados a elementos transponíveis em *Characidium* (Pucci et al. 2014). Por outro lado, a distribuição dos genes para snRNA U2 mostrou-se extremamente conservada no gênero, sendo identificado como portador destas sequências apenas um único par cromossômico (par número 1), aparentemente homólogo em quase todas as espécies. Estes dados são consistentes com estudos prévios realizados em peixes (Utsunomia et al. 2014) e gafanhotos (Bueno et al. 2013; Palacios-Gimenez et al. 2013), que mostram este estado de conservação no número e posição destes sítios em espécies próximas.

Adicionalmente, também foi observada a co-localização de *clusters* de snDNA U2 e DNAr 5S em três grupos distintos de espécies, estando no par 1 de *C. vestigipinne* e *C. orientale*, espécies da região Sul do Brasil e no par 17 de *Characidium* sp2, coletada na bacia do Rio Paraguai, espécies estas que apresentam cromossomos sexuais; e no par 1 de *C. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmosum*, espécies que não apresentam cromossomos sexuais. Desta forma, o presente trabalho relata exemplos adicionais da co-localização entre genes U e sítios ribossômicos, uma característica já descrita em algumas espécies (Pelliccia et al. 2001; Manchado et al. 2006; Merlo et al. 2010). Acredita-se, pois que novas investigações são

necessárias para determinar se este posicionamento conjunto de sequências gênicas ocorre de forma independente e aleatória neste grupo, ou se estaria associada a fatores determinantes de possíveis vantagens seletivas.

Diversificação e evolução de cromossomos sexuais

O heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo observado em distintas espécies do gênero *Characidium* se caracteriza como um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e ocorre em diferentes espécies deste gênero (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, 2014; Pazian et al. 2013, Pucci et al. 2014, Scacchetti et al. 2014; Capítulo 2). Todas as espécies aqui analisadas, com exceção de *C. cf. zebra*, *C. tenue*, *C. xavante* e *C. stigmatosum* apresentaram cromossomos sexuais em distintos estágios de diferenciação. Com estas informações, o número de espécies que não apresentam cromossomos sexuais neste gênero foi aumentado para cinco.

Um modelo consensual para explicar a origem do sistema de cromossomos sexuais encontrado nas espécies deste gênero propõe uma origem única a partir de um cromossomo autossômico portador das RONS, possivelmente o par 2 de *C. zebra* (revisão em Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2014). No entanto, uma característica intrigante envolve o agrupamento de *C. xavante* e *C. lagosantense*, espécies sem cromossomos sexuais, no clado C4 deste gênero, um grupo que também compreende as espécies *C. rachovii*, *C. vestigipinne*, *C. orientale*, *C. occidentale* e *C. lanei*, nas quais foi identificado o polimorfismo correspondente aos cromossomos sexuais diferenciados (Netto-Ferreira et al. 2013). Considerando-se os diversos estudos realizados em vertebrados que evidenciam a ocorrência de cromossomos sexuais com origens independentes mesmo em espécies próximas e ainda trabalhos recentes que mostram raros exemplos da perda evolutiva de cromossomos sexuais altamente diferenciados (Mank et al. 2006; Henning et al. 2008; Pokorná & Kratochvíl 2009; Vicoso & Bachtrog 2013; Koubová et al. 2014), propõe-se a necessidade do estabelecimento de uma filogenia robusta para a família Crenuchidae, bem como a análise citogenética de espécies pertencentes à subfamília Characidiinae como são passos essenciais a serem cumpridos antes de se elaborar um modelo definitivo para a origem do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais nesse grupo. Além disso, Oliveira et al. (2011) postularam que *Characidium* não é suportado como um grupo monofilético, o que reforça ainda mais esta necessidade destas abordagens.

Apesar das indefinições existentes, o presente trabalho fornece evidências de que os cromossomos sexuais analisados em todas as espécies portadoras compartilham sequências entre si, como já demonstrado anteriormente (Machado et al. 2011; Pazian et al. 2013; Pucci et al. 2014; Pansonato-Alves et al. 2014). No entanto, embora aparentemente homeólogos, é possível observar um extenso polimorfismo interespecífico em relação ao tamanho, morfologia e graus de heterocromatinização destes cromossomos (Figura 6) nas diferentes espécies. Tais variações refletem os diversos mecanismos que atuam na diferenciação destes cromossomos, incluindo processos de heterocromatinização, rearranjos cromossômicos, deleção ou amplificação de segmentos e acúmulo diferencial de sequências de DNA repetitivo, como genes ribossômicos e microssatélites (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011; Capítulo 2).

Dados obtidos nos últimos anos sugerem que a variação no grau de diferenciação dos cromossomos sexuais em *Characidium* estaria diretamente relacionada com a presença ou ausência de sítios de RONS nos cromossomos sexuais. Assim, espécies que apresentam graus intermediários de diferenciação apresentam RONS nos cromossomos sexuais, enquanto espécies com cromossomos sexuais altamente diferenciados não possuem RONS nestes cromossomos (Pansonato-Alves et al. 2011; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). No entanto, exceções a esta associação já foram descritas, como observado em *C. vidali* (Capítulo 2). Nossos dados evidenciam espécies adicionais que não seguem esta regra, tais como *C. orientale* e *C. rachovii* que apresentaram os cromossomos Z e W portadores do DNAr 18S mas com alto grau de diferenciação, bem como *Characidium* sp1 e *Characidium* sp3, espécies sem DNAr 18S nos cromossomos sexuais, mas com graus intermediários de diferenciação. Notavelmente, *C. orientale* e *C. rachovii* apresentam sítios de DNAr 5S alocados nos seus respectivos cromossomos W, o que poderia ser um fator de diminuição da frequência de recombinação entre eles e, conseqüentemente, favorecer o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais, justificando o alto grau de heterocromatinização dos cromossomos W.

Dados citogenéticos obtidos para *Characidium* sugerem que o isolamento de espécies e populações em riachos de cabeceira de distintos sistemas hidrográficos estaria diretamente ligado à alta diversificação cromossômica observada para o gênero, tanto no conjunto autossômico como nos cromossomos sexuais (Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Após a diferenciação alopátrica, algumas espécies poderiam eventualmente estabelecer novos contatos em eventos de captura, mas provavelmente já estariam reprodutivamente isoladas, como é o caso de *C. cf. zebra* e *C.*

gomesi na bacia do alto rio Paraná; e *C. alipioi* e *C. lauroi* na bacia do rio Paraíba do Sul (revisão em Pucci et al. 2014).

Espécies simpátricas já descritas também foram analisadas no presente trabalho, incluindo *Characidium* sp. aff. *C. vidali* com *C. vidali* e *Characidium* sp6 com *C. serrano*, sendo que híbridos interespecíficos aparentemente não foram identificados em nenhuma destas localidades. Embora os dois conjuntos de espécies simpátricas apresentem cromossomos sexuais diferenciados, é possível identificar um certo grau de diferenciação cromossômica entre eles, como a ocorrência de um par acrocêntrico em *C. serrano* e a sua ausência em *Characidium* sp6; e a variação de sítios ribossômicos e snDNA U2 entre *Characidium* sp. aff. *C. vidali* com *C. vidali*, além da ocorrência de cromossomos Bs em *Characidium* sp. aff. *C. vidali* (Scacchetti et al. 2014, presente trabalho). Tais variações refletem também a diversificação genética entre as espécies que pode ter ocorrido durante o processo de diferenciação alopátrica. De fato, *C. serrano* é uma espécie intimamente relacionada à *C. pterostictum* (espécie litorânea) e a sua ocorrência na bacia do rio Uruguai está relacionada a intercâmbios de drenagens que frequentemente ocorrem nesta área (Ribeiro 2006; Scacchetti et al. 2014).

Utilizando técnicas citogenéticas diversificadas foi possível descrever os cariótipos de diversas espécies de *Characidium*, resultando no aumento do conhecimento sobre a distribuição genômica de diferentes tipos de DNA repetitivo, o surgimento de cromossomos B no gênero e a diferenciação dos cromossomos sexuais em diferentes espécies. Os dados aqui obtidos permitem melhorar o conhecimento sobre a origem deste tipo de cromossomos particulares encontrados neste grupo.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Tabela 1. Espécies de *Characidium* analisadas no presente trabalho.

<u>Espécies</u>	<u>Coordenadas</u>	<u>Localidade</u>
<i>C. vestigipinne</i>	S 28°08'03,4'' W 52°18'40,7''	Cabeceira rio Caraguatá – Coxilha - RS
<i>C. rachovii</i>	S 32°05'24,1'' W 52°15'09,7''	Banhado arroio cabeças – Rio Grande - RS
<i>C. orientale</i>	S 32°11'26,3'' W 52°59'30,5''	Arroio chasqueiro – Arroio Grande - RS
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	S 22°28'51.79'' W 42°23'39.06''	Córrego Bananeiras, bacia do rio São João, Silva Jardim - RJ
<i>C. sp1</i>	S 9°50'37.13'' W 67°52'39.15''	Rio Branco – Bacia Amazônica - AC
<i>C. sp2</i>	S 14°36'12.73'' W 57°40'51.79''	Rio Russo – Bacia do rio Paraguai - MT
<i>C. sp3</i>	S 14°20'33.12'' W 57°31'25.68''	Rio Vermelho – Bacia do rio Paraguai – Tangará da Serra - MT
<i>C. sp4</i>	S 13°48'03'' W 56°01'38''	Rio Arinos – Bacia Amazônica – Nova Mutum - MT
<i>C. sp5</i>	S 3°46'37.18'' W 73°20'09.37''	Rio Nanay – Bacia Amazônica - Iquitos – Peru
<i>C. sp6</i>	S 28°08'01,8'' W 55°13'56,9''	Arroio Canoinha – Entre Pirapó e São Nicolau - RS
<i>C. cf. zebra</i>	S 14°38'16.00'' W 57°09'03.52''	Rio Duas Antas – Bacia do rio Paraguai – Tangará da Serra - MT
<i>C. tenue</i>	S 33°41'22,6'' W 53°26'22,3''	Rio Chuí, bacia do rio Chuí, Chuí-SC
<i>C. xavante</i>	S 14°25'33,8'' W 54°00'56,6''	Tributário rio Xingu – Paranatinga - MT
<i>C. stigmatosum</i>	S 13°45'18,5'' W 47°27'20,0''	Tributário do rio Ave Maria, bacia do rio Tocantins, Cavalcante – GO

Tabela 2- Diferentes espécies/populações de *Characidium* estudados até o momento. Destaque para presença/ausência de sistema de cromossomos sexuais e a localização do DNAr 18S.

Espécies	Local de coleta	Cromossomo sexual ZZ/ZW	DNAr 18S presente ou ausente no sexual	Referência
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Paiol Grande, bacia do rio Sapucaí, São Bento do Sapucaí - SP	Ausente	Par 23	Centofante et al. 2001
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Machado, bacia do rio Sapucaí, São João da Mata - MG	Ausente	Par 23	Silva e Maistro 2006
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Paraitinga, bacia do alto Tietê, Salesópolis - SP	Ausente	Par 23	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Paraitinga, bacia do alto Tietê, Salesópolis - SP	Ausente	Par 23	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Alambari, bacia do rio Tietê, Botucatu - SP	Ausente	Par 23	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Novo, bacia do rio Paranapanema, Avaré - SP	Ausente	Par 23	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Juba, bacia do rio Paraná, Nova Fernandópolis - MT	Ausente	Par 23	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium zebra</i>	Rio Passa Cinco, bacia do rio Piracicaba, Ipeúna - SP	Ausente	Par 23	Machado et al. 2011
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Ribeirão Claro, bacia do rio Tietê, Rio Claro - SP	Ausente	Não disponível	Pazian et al. 2013
<i>Characidium cf. lagosantense</i>	Córrego Amendoim, bacia do rio das São Francisco, Curvelo-MG	Ausente	Não disponível	Pazian et al. 2013
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	Rio das Velhas, bacia do rio São Francisco - MG	Presente	Não disponível	Pazian et al. 2013
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Duas Antas, bacia do rio Paraguai, Tangará da Serra - MT	Ausente	Par 23	Presente estudo
<i>Characidium tenue</i>	Rio Chuí, bacia do rio Chuí, Chuí-SC	Ausente	Par 23	Presente estudo
<i>Characidium xavante</i>	Tributário rio Paranatinga, bacia do rio Xingu, Paranatinga - MT	Ausente	Par 23	Presente estudo
<i>Characidium stigmosum</i>	Tributário do rio Ave Maria, bacia do rio Tocantins, Cavalcante - GO	Ausente	Par 23	Presente estudo

<i>Characidium lauroi</i>	Tributário do rio Grande, bacia do rio Coastal, Ubatuba –SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium lauroi</i>	Córrego Grande, Paraíba do Sul - SP	Presente	Presente	Machado et al. 2011
<i>Characidium pterostictum</i>	Rio Betari, bacia do rio Betari, Apiaí - SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium pterostictum</i>	Lagoa Itapeva, bacia do rio Tramandaí, Três Forquilhas - RS	Presente	Presente	Scacchetti et al. 2014
<i>Characidium pterostictum</i>	Drenagem da bacia do rio Uruguai, Cruz Alta - RS	Presente	Presente	Scacchetti et al. 2014
<i>Characidium serrano</i>	Arroio canoinha, bacia do rio Uruguai, Entre Pirapó e São Nicolau – RS	Presente	Presente	Scacchetti et al. 2014
<i>Characidium oiticicai</i>	Rio Paraitinga, bacia do Alto Tietê, Salesópolis – SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium oiticicai</i>	Rio Paraitinguinha, bacia do Rio Tietê, Salesópolis – SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2014
<i>Characidium lanei</i>	Rio Barroca, bacia do atlântico - PR	Presente	Presente	Noleto et al. 2009
<i>Characidium lanei</i>	Córrego Cari Morretes - PR	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium sp.</i>	Tributário do rio Preto, Itanhaém - SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010
<i>Characidium sp.</i>	Rio Formoso, bacia do Alto Paraná, Chapadão do Céu - GO	Presente	Não disponível	Pazian et al. 2013
<i>Characidium sp.</i>	Córrego Corredeira, bacia do rio Tietê, Poloni - SP	Presente	Presente	Pucci et al. 2014
<i>Characidium schubarti</i>	Rio Cinco Réis, bacia do rio Jaguariaíva, Jaguariaíva-PR	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2010

<i>Characidium cf. gomesi</i>	Alambari Stream, Tietê River basin, Botucatu-SP	Presente	Presente	Pansonato-Alves et al. 2011
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Alambari, bacia do rio Tietê, Botucatu – SP	Presente	Presente	Machado et al. 2011
<i>Characidium cf. gomesi</i>	Rio Cachoeira, bacia do alto Paraná, Itumirin – GO	Presente	Não disponível	Pazian et al. 2013
<i>Characidium cf. gomesi</i>	Rio Novo, bacia do Paranapanema, Avaré - SP	Presente	Par 18	Pansonato-Alves et al. 2011
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Paiol Grande, bacia do rio Sapucaí, São Bento de Sapucaí – SP	Presente	Par 18	Centofante et al. 2001
<i>Characidium gomesi</i>	Rio Machador, bacia do rio Sapucaí, São João da Mata – MG	Ausente	Par 17	Silva & Maistro 2006
<i>Characidium cf. gomesi</i>	Rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa – PR	Presente	10 pares marcados	Vicari et al. 2008
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Minhoca, bacia do rio São Francisco-MG	Presente	18S/terminal/pair 17	Machado et al. 2011
<i>Characidium gomesi</i>	Rio Verde, bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa – PR	Presente	Par 17 e 22 e um dos homólogos do par 1 e 20	Machado et al. 2011
<i>Characidium sp. cf. C. alipioi</i>	Córrego Ribeirão Grande, bacia do Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-SP	Presente	Não disponível	Centofante et al. 2003
<i>Characidium heirmostigmata</i>	Rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí, Prudentópolis - PR	Presente	Par 4	Pucci et al. 2014
<i>Characidium timbuiense</i>	Córrego Valsugana Velha, bacia do rio Reis Magos, Santa Teresa - ES	Presente	Presente	Scacchetti et al. 2014
<i>Characidium vidali</i>	Córrego Bananeiras, bacia do rio São João, Silva Jardim - RJ	Presente	Par 18	Scacchetti et al. 2014

<i>Characidium</i> sp1	Rio Branco, bacia Amazônica - Acre	Presente	Par 7	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp2	Rio russo, bacia do rio Paraguai, Tangará da Serra-MT	Presente	Par 7	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp3	Rio vermelho, bacia do rio Paraguai, Tangará da serra - MT	Presente	Presente no W e um dos homólogos par 7.	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp4	Rio Arinos, bacia Amazônica, Nova mutum - MT	Presente	Par 1	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp5	Rio Nanay , Iquitos – Peru	Presente	Par 7	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp6	Arroio canoinha, bacia do rio Uruguai – Entre Pirapó e São Nicolau - RS	Presente	Par 19	Presente estudo
<i>Characidium vestigipinne</i>	Cabeceira do rio Caraguatá, bacio do alto rio Uruguai, Coxilha-RS	Presente	Presente	Presente estudo
<i>Characidium rachovii</i>	Arroio Cabeças, bacia do rio Uruguai, Rio Grande - RS	Presente	Presente	Presente estudo
<i>Characidium orientale</i>	Arroio Chasqueiro, bacia do rio Uruguai, Arroio Grande - RS	Presente	Presente	Presente estudo
<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	Córrego Bananeiras, bacia do rio São João, Silva Jardim - RJ	Presente	Par 21	Presente estudo

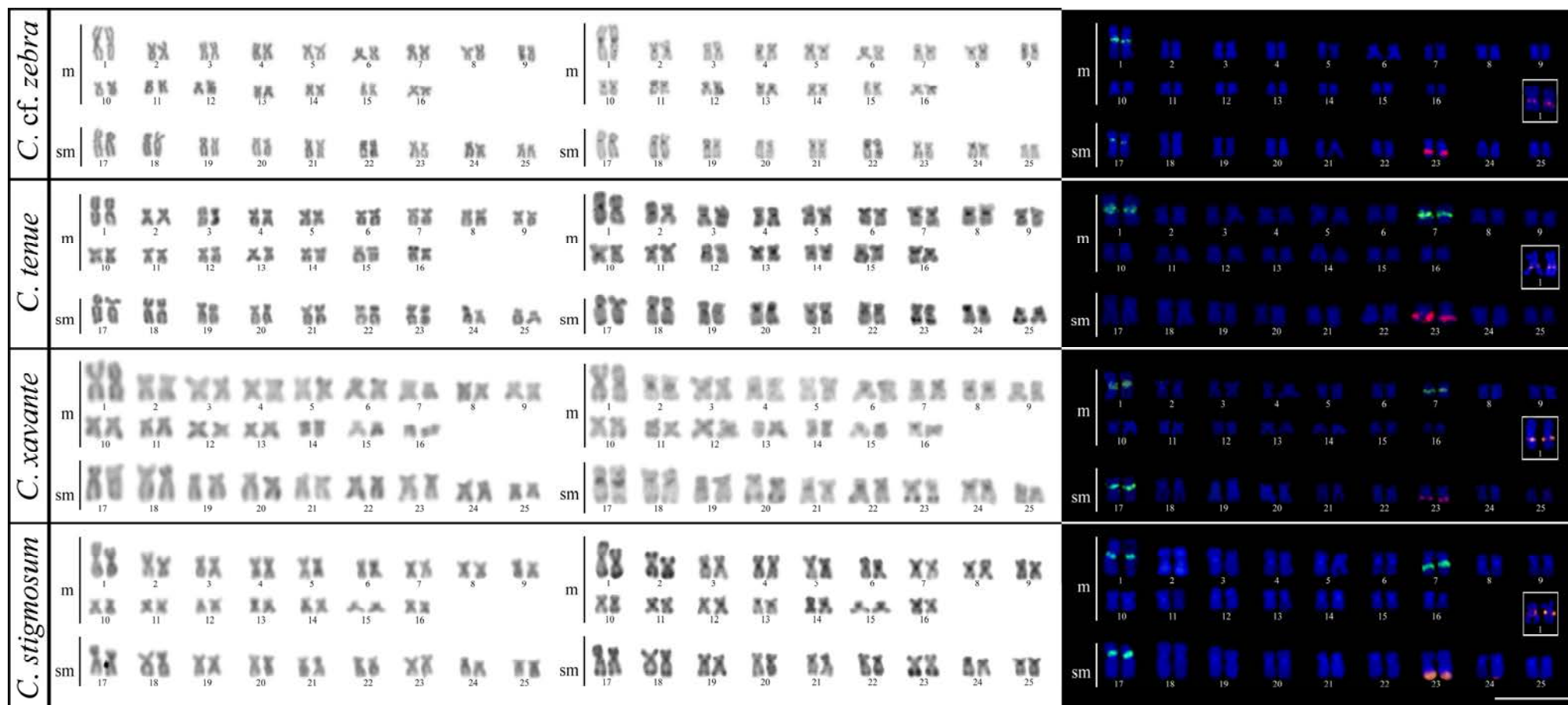


Figura 1: Cariótipos sequenciais de espécies de *Characidium* sem sistema de cromossomos sexuais. Coloração convencional com Giemsa (esquerda) e cromossomos após bandamento C (ao centro). A direita estão os cariótipos após FISH com sonda de DNAr 5S (verde) e de DNAr 18S (vermelho) e snDNA U2 in box (vermelho). A barra equivale à 10 μ m.

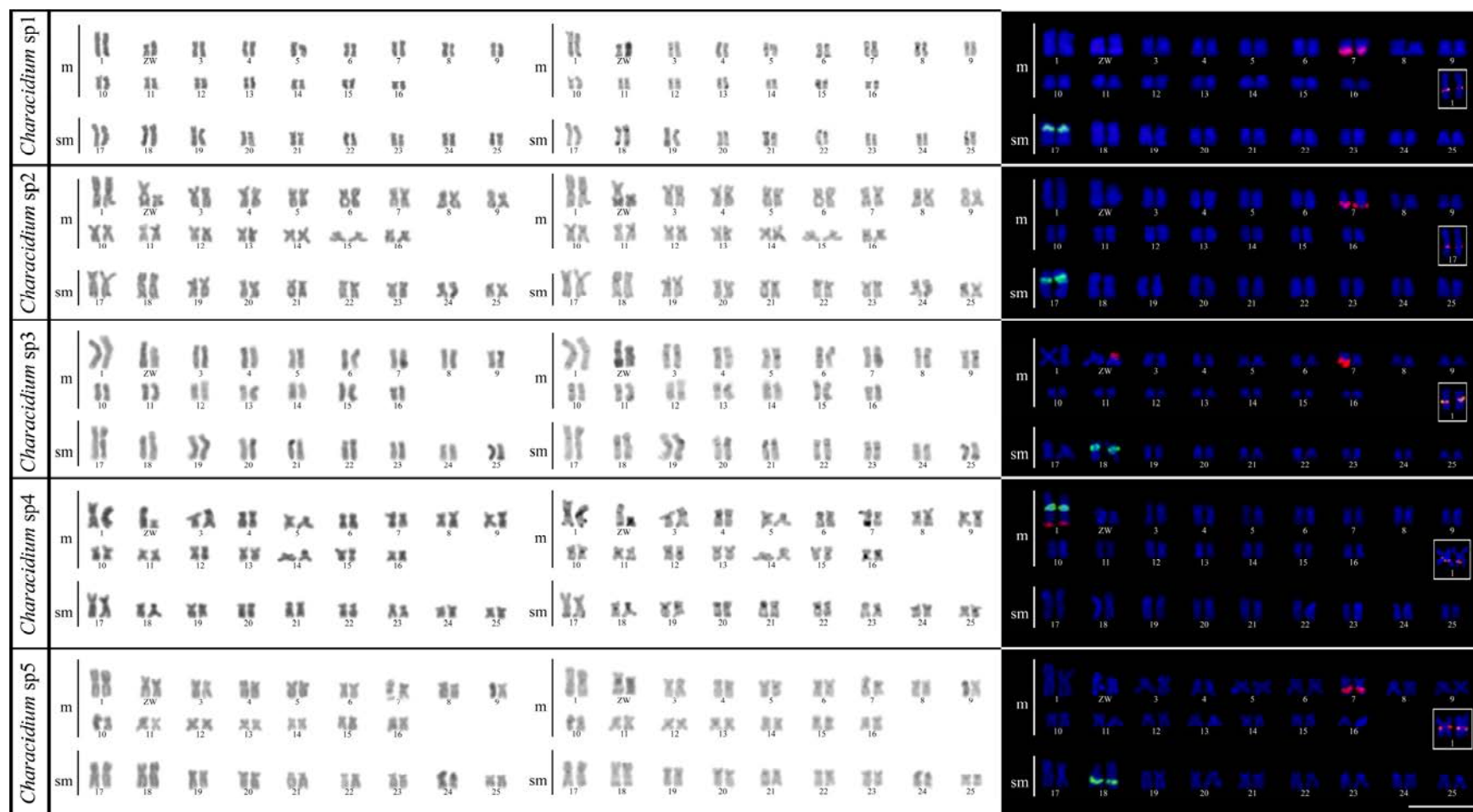


Figura 2: Cariótipos sequenciais de espécies de *Characidium* coletadas nas bacias do rio Paraguai e Amazônica. Coloração convencional com Giemsa (esquerda) e cromossomos após bandamento C (ao centro). A direita estão os cariótipos após FISH com sonda de DNAr 5S (verde) e de DNAr 18S (vermelho) e snDNA U2 in box (vermelho). A barra equivale à 10 µm.

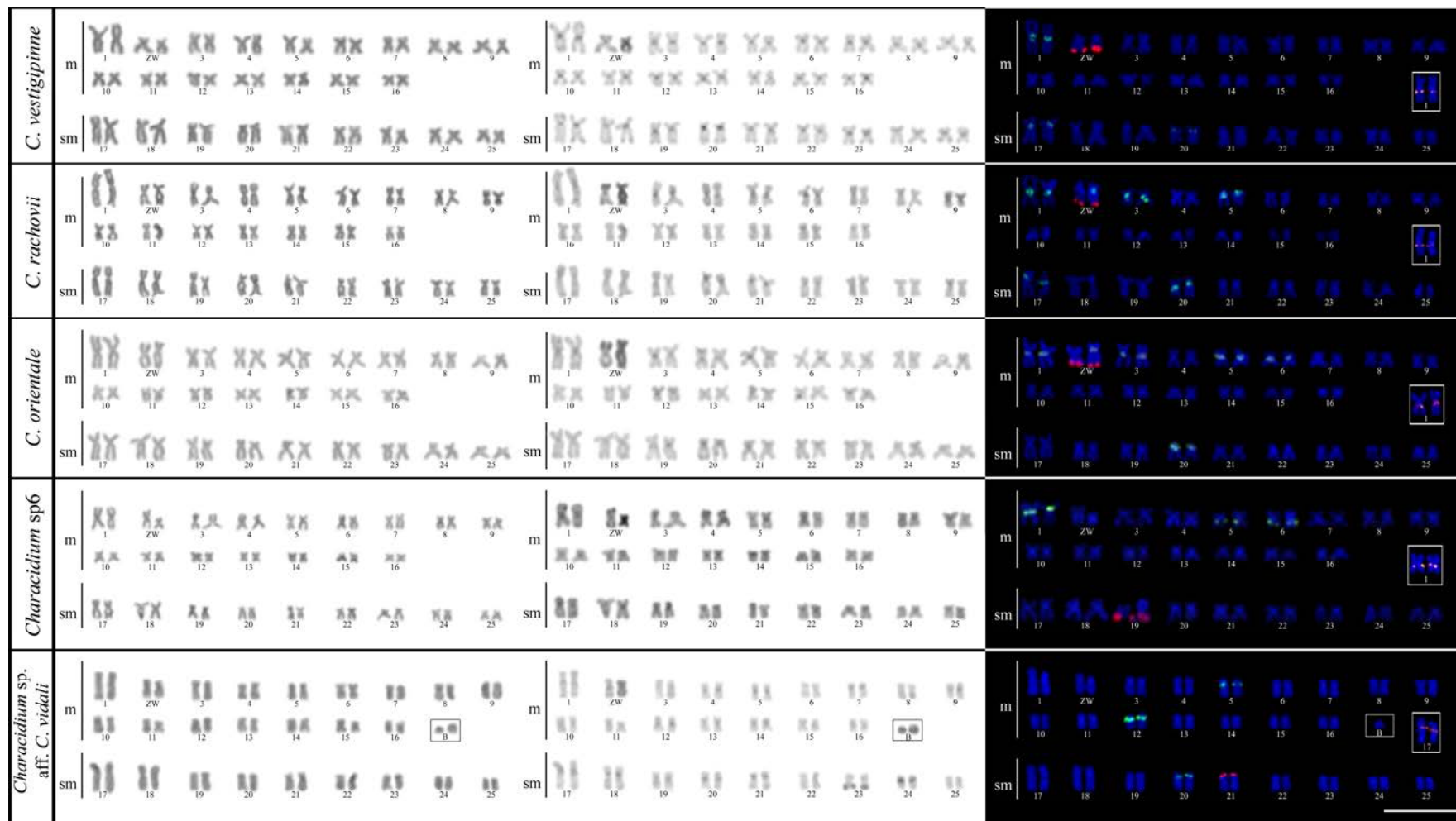


Figura 3: Cariótipos sequenciais de espécies de *Characidium* coletadas nas bacias do rio Uruguai e costa leste brasileira. Coloração convencional com Giemsa (esquerda) e cromossomos após bandamento C (ao centro). A direita estão os cariótipos após FISH com sonda de DNAr 5S (verde) e de DNAr 18S (vermelho) e snDNA U2 in box (vermelho). A barra equivale à 10 μ m.

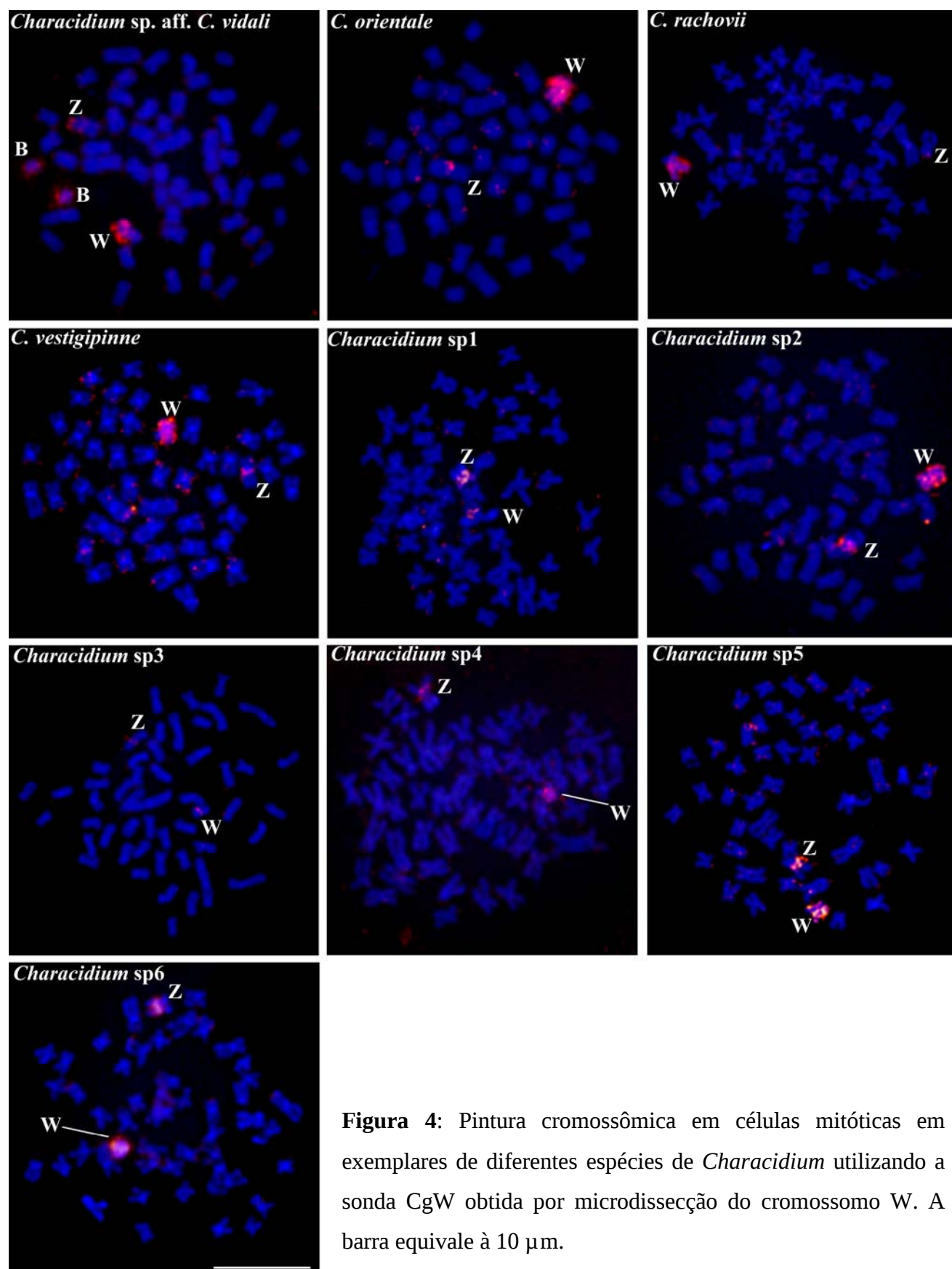


Figura 4: Pintura cromossômica em células mitóticas em exemplares de diferentes espécies de *Characidium* utilizando a sonda CgW obtida por microdissecção do cromossomo W. A barra equivale à 10 μ m.

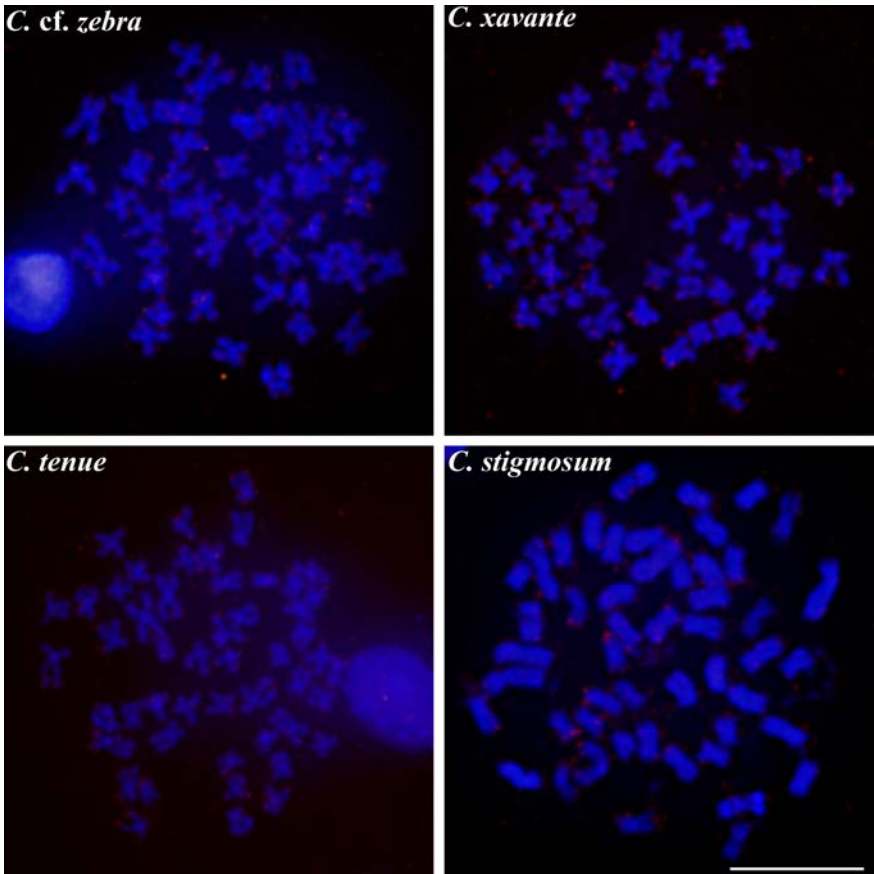


Figura 5: Pintura cromossômica em células mitóticas dos exemplares de *Characidium* sem sistema de cromossomos sexuais utilizando a sonda CgW obtida por microdissecção. A barra equivale à 10 µm.

Espécie	<i>C. vestigipinne</i>	<i>C. rachovii</i>	<i>C. orientale</i>	<i>Characidium</i> sp. aff. <i>C. vidali</i>	<i>Characidium</i> sp1	<i>Characidium</i> sp2	<i>Characidium</i> sp3	<i>Characidium</i> sp4	<i>Characidium</i> sp5	<i>Characidium</i> sp6
Giemsa										
Banda C										
DNAr 5S										
DNAr 18S										
WCP										

Figura 6: Cromossomos Z e W das espécies de *Characidium* analisadas no presente estudo após coloração convencional com Giemsa, bandamento C, FISH com sonda de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) e pintura cromossômica com a sonda CgW obtida por microdissecção. A barra equivale a 5 µm.

Capítulo 4

Detecção de múltiplos SNPs e sequências associados ao sexo em espécies do gênero *Characidium* (Teleostei: Characiformes) a partir de *Characidium gomesi*

Resumo

O gênero de peixes *Characidium* está distribuído amplamente pela região Neotropical e apresenta espécies com sistema heteromórfico de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, enquanto algumas espécies não mostram qualquer heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. Uma vez que os mecanismos que norteiam a determinação sexual em peixes são pouco conhecidos e bastante diversos, o objetivo do presente estudo foi realizar uma caracterização inicial de marcadores moleculares associados ao sexo na espécie *C. gomesi* – espécie que apresenta cromossomos sexuais altamente diferenciados, utilizando a técnica de *RAD-sequencing*. Os resultados obtidos revelaram centenas de marcadores com altos índices de *Fst* (≥ 0.10) entre machos e fêmeas, além de 26 *loci* fêmea-específicos. No entanto, apenas 1 dos marcadores encontrados apresentou uma alta similaridade com o gene *Foxl2*, conhecido por participar da cascata de diferenciação sexual. Adicionalmente, 13 pares de *primers* foram construídos utilizando as 26 sequências fêmea-específicas e confirmaram o caráter diagnóstico destes marcadores em relação ao sexo. Os dados obtidos representam avanços importantes no estudo dos mecanismos envolvidos no processo de determinação sexual em peixes e serão importantes para um melhor entendimento sobre a conservação e extensão do sistema ZZ/ZW no gênero *Characidium*.

Introdução

Os cromossomos sexuais representam uma fração pequena de qualquer genoma e são considerados elementos intrigantes, pois apresentam características distintivas do complemento autossômico, como composição nucleotídica e modelo de evolução (Mank et al. 2006; Vicoso & Charlesworth 2006; Ellegren 2011). Dentre os vertebrados, o grupo dos peixes se destaca por exibir padrões de determinação e diferenciação sexual muito variadas, que se refletem também na diversidade dos processos reprodutivos, com a ocorrência de muitas espécies gonocorísticas e hermafroditas, além de unissexuais (Devlin & Nagahama 2002; Kamiya et al. 2012).

Em espécies gonocóricas, diversas formas de determinação genética e/ou ambientais já foram identificadas como fatores de determinação sexual, incluindo: i) heterogametia masculina ou feminina, com ou sem a influência de *loci* autossômicos; ii) ausência de cromossomos sexuais, porém envolvendo vários *loci* distribuídos pelos cromossomos do complemento; ou ainda iii) presença de múltiplos pares de cromossomos sexuais (Penma & Piferrer 2008; Piferrer et al. 2012). Embora os cromossomos sexuais não apresentem diferenças claras com relação ao tamanho ou no conteúdo gênico na maioria das espécies (Devlin & Nagahama 2002), cinco diferentes genes denominados *master-sex* já foram documentados nos peixes e incluem Dmy/dmrt1bY, Gsdf1, AmhY, Amhr2 e sdY (Matsuda et al. 2002; Hattori et al. 2012; Kamiya et al. 2012; Myosho et al. 2012; Yano et al. 2012, 2013).

Dentre as variáveis que podem afetar o desenvolvimento sexual nos organismos, os cromossomos sexuais se destacam por representarem um sistema genético com uma dinâmica evolutiva incomum em diversos aspectos, destacando-se, principalmente, a sua labilidade. Notavelmente, os peixes podem apresentar diferentes tipos de cromossomos sexuais sem uma clara relação de homologia entre eles, até mesmo em linhagens próximas (Mank et al. 2006; Piferrer et al. 2012; Martínez et al. 2014). Exemplos interessantes incluem espécies pertencentes a um mesmo gênero e portadoras de sistemas de cromossomos sexuais distintos, como os representantes do gênero *Eigenmannia*, cujas espécies podem exibir sistemas simples do tipo XX/XY e ZZ/ZW e também sistemas múltiplos de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2Y$, o qual, deve-se destacar, não apresenta homologia com o sistema XY (Almeida-Toledo et al. 2000; Almeida-Toledo & Foresti 2001; Henning et al. 2008; Silva et al. 2009). Por exibir tal variabilidade, os peixes da região Neotropical constituem um excelente material para estudos cromossômicos e dos mecanismos moleculares que norteiam a determinação do sexo.

O gênero *Characidium* está inserido na família Crenuchidae e é o mais especioso da subfamília Characidiinae, sendo constituído por cerca de 70 espécies (Eschmeyer 2015), com informações citogenéticas disponíveis para 30 delas (Capítulo 3). Até o presente momento, os dados cariotípicos evidenciam que, embora o número diploide de $2n=50$ seja bastante conservado neste gênero, pelo menos cinco espécies não apresentam qualquer heteromorfismo cromossômico aparente relacionado ao sexo, enquanto todas as outras exibem um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em distintos estágios de diferenciação (Centofante et al. 2001; Vicari et al. 2008; Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pazian et al. 2013;

Pucci et al. 2014; Scacchetti et al. 2014; Capítulos 2 e 3 deste trabalho). Tal característica torna este grupo um interessante modelo de estudo para a compreensão dos mecanismos citogenéticos e moleculares envolvidos no surgimento e evolução de cromossomos sexuais, bem como da determinação sexual em peixes.

Apesar da concentração de esforços feitos nos últimos anos, estudos relativos aos genes que participam na cascata da determinação do sexo em peixes ou mesmo a caracterização de marcadores moleculares relacionados ao sexo ainda são bastante escassos (revisão em Martínez et al. 2014). Diante do exposto, o sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição (RAD: *restriction associated DNA sequencing*) através do sistema *Illumina Genome Analyzer* em machos e fêmeas de *C. gomesi* foi realizado no presente trabalho com o intuito de identificar sequências associadas ao processo de determinação de sexo. Estas informações serão úteis para uma melhor compreensão sobre os processos evolutivos envolvidos na determinação sexual em peixes, e em particular do sistema de determinação sexual nesta espécie.

Materiais e Métodos

Material experimental

No presente estudo, foram analisados 39 exemplares da espécie *C. gomesi* (20 fêmeas e 19 machos), que apresenta cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW altamente diferenciado (Figura 1). Os exemplares foram coletados na Cachoeira Véu de Noiva, bacia do rio Paranapanema, Botucatu-SP. O sexo de cada indivíduo foi identificado visualmente pela observação de gônadas desenvolvidas e fragmentos de tecido renal e muscular foram retirados e conservados em etanol 100% para extração de DNA. Os exemplares analisados foram fixados em formol 5%, conservados em álcool 70% e foram depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Preparação das bibliotecas RAD e sequenciamento

O DNA de 39 indivíduos foi extraído de tecido muscular com o kit NucleoSpin® Tissue Columns, Collection Tubes (2 mL), Proteinase K (PRODIMOL) e tratadas com RNase A (20 mg / ml - Invitrogen) para remoção do RNA residual conforme instruções do fabricante. Todas as extrações foram quantificadas por espectrofotômetro (Nanodrop), a

qualidade foi avaliada por gel de agarose 1% (Figura 2) e, finalmente, as amostras foram diluídas à uma concentração igual de 50 ng/mL em 5 mmol/L Tris, pH 8.5.

Foram construídas 39 bibliotecas correspondentes aos machos (n=19) e fêmeas (n=20), sendo que as sequências provindas de cada um dos indivíduos puderam ser identificadas posteriormente por uma sequência nucleotídica curta integrada nos adaptadores (*barcode*) indivíduo-específico. A digestão enzimática foi realizada com a enzima SbfI, que permite a obtenção de um número de fragmentos suficiente para uma varredura genômica muito densa (em torno de 300.000 sítios de restrição estimados). Os protocolos utilizados seguiram os procedimentos descritos por Baird et al. (2008), detalhado em Etter et al. (2011) com pequenas modificações feitas em Houston et al. (2012). Os adaptadores específicos RAD *paired-ends* P1 e P2, a amplificação das bibliotecas por PCR e as sequências dos *primers* que foram usadas neste estudo estão detalhados em Baxter et al. (2011). Após a preparação, as bibliotecas foram sequenciadas utilizando o módulo *paired-end* do *Genome Analyzer II* 100bp (HiSeq2500), seguindo o protocolo RTA 1.12.4.2 e Casava 1.6 (Illumina) na Universidade de Oxford (High-Throughput Genomics Group).

Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas foram realizadas de forma concomitante e complementar em diferentes Instituições: i) Universidade de Santiago da Compostela, Lugo, Espanha, sob supervisão do Dr. Paulino Martinez Portela e Dr. Miguel Hermida; ii) Universidade de Stirling, Stirling, Reino Unido, sob supervisão do Dr. John B. Taggart e Dr. Michaël Bekart; iii) University College London (UCL), Inglaterra, sob a supervisão da Dra. Judith Mank e iv) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil sob supervisão do Dr. Fausto Foresti. O *software* Stacks v1.24 (Catchen et al. 2011) foi utilizado para identificar e genotipar os *loci* no grupo de 39 amostras ou indivíduos, e o Velvet Assembler v1.2.08 (Zerbino et al. 2008) para a extração de *reads paired-end* de cada RAD-tag sequenciado. Além disso, para a seleção dos SNPs mais informativos associados ao sexo, foram utilizados os valores mais elevados dos índices de fixação *Fst* entre os sexos através do programa GenePop 4.2 (Rousset 2008). Em uma primeira seleção, foram escolhidos os *loci* que mostraram diferenças significativas entre sexos mediante um teste de contingência ($P < 0.05$) e que apresentaram índice $Fst \geq 0.10$ entre machos e fêmeas (Tabela 1). Foi, ainda, detectado e selecionado um conjunto de *loci* presente exclusivamente nas fêmeas (Tabela 2). Após esta seleção, buscas de similaridade destas sequências foram realizadas contra o genoma de referência mais próximo ao gênero

Characidium (zebrafish - *Danio rerio*) e no banco de dados do NCBI (Tabela 2 e 3). Adicionalmente, buscas de similaridade de sequências repetitivas putativas foram realizadas no bando de dados Repbase (Tabela 4).

Resultados e Discussão

Uma alta variabilidade genética tem sido descrita para diferentes espécies de peixes no que se refere aos genes responsáveis pela determinação do sexo, incluindo o número de genes envolvidos e suas relações (revisão em Martinez et al. 2014). No entanto, deve-se destacar que este tipo de investigação vem sendo realizado em espécies-modelo na maioria das vezes. No presente trabalho, a aplicação da metodologia de sequenciamento de *RAD-tags*, em associação com as análises que visam a produção de marcadores *de novo*, possibilitou a geração de um grande conjunto de marcadores associados a uma determinada característica, neste caso, o sexo em uma espécie não modelo e sem um genoma de referência. O sequenciamento de uma *lane* na plataforma Illumina HiSeq 2500 gerou dois arquivos FASTAQ representando 75Gb e cerca de 200 milhões de sequências em cada arquivo, totalizando 284.836.820 *raw reads* de 100 pb cada. A qualidade das sequências foi analisada pelo *software* FastQC, mostrando uma media de 37 pelo medidor de qualidade Phred, indicativa de boa qualidade, sendo que o princípio e o final das sequências eram as zonas de qualidade inferior. (Figura 3).

O *software* Stacks (Catchen et al. 2011) possibilitou a identificação de sequências idênticas em cada indivíduo agrupando-as em pilhas (*stacks*) correspondentes ao mesmo *locus* (RAD-tags) e a identificação dos *loci* comuns entre os indivíduos analisados. Com esta organização foi possível comparar milhares de *loci* provenientes de 39 indivíduos distintos, o que permitiu a detecção de um grande número de SNPs (variações nucleotídicas de base única). De forma detalhada, com os módulos stacks e cstacks, foram identificadas pilhas de sequências compartilhadas em mais de um indivíduo que se ordenaram em um catálogo comum, no qual 290,951 destas pilhas (RAD-tags) foram identificadas nos 39 indivíduos analisados.

A maioria dos RAD-tags identificados era de característica monomórfica e, portanto, não apresentaram variações, além de muitos serem restritos a apenas um ou poucos indivíduos. Por esta razão, 51,156 RAD-tags foram inicialmente selecionados por apresentarem possíveis SNPs em pelo menos um indivíduo. Posteriormente, utilizando uma filtragem mais exaustiva, 3,568 SNPs foram selecionados, sendo todos polimórficos e

presentes em pelo menos 95% dos indivíduos analisados. Após esta seleção, um cálculo estatístico populacional considerando machos e fêmeas como duas populações distintas foi realizado. Assim, com base no valor de F_{st} entre os sexos, 204 sequências que apresentaram diferenças significativas ($P < 0.05$; $F_{st} \geq 10\%$) foram selecionadas para as análises seguintes (Tabela 1). Além disso, 26 *loci* foram encontrados exclusivamente nas fêmeas e foram selecionados para análises posteriores (Tabela 2). Os resultados obtidos corroboram com os dados citogenéticos que indicam que a fêmea é o sexo heterogamético nesta espécie e dão indícios que estas sequências podem estar alocadas nos cromossomos sexuais de *C. gomesi*.

A busca de similaridade utilizando a ferramenta BLAST ($E\text{-value} < 10^{-5}$) contra o genoma de *D. rerio* revelou que alguns *loci* selecionados podem estar alocados em grupos de ligação únicos ou múltiplos no genoma desta espécie (Tabela 1). Notavelmente, poucas sequências estavam exclusivamente nos grupos de ligação 5 e 16 desta espécie, ambos reportados como portadores dos *loci* determinantes do sexo (Bradley et al. 2011). No entanto, deve-se destacar que a grande maioria dos *loci* buscados não apresentaram qualquer semelhança com o genoma de *D. rerio* e, desta forma, novas buscas foram realizadas no banco de dados do NCBI, através dos programas BLASTn e BLASTx (Tabela 2 e 3).

Os resultados indicaram semelhanças com vários tipos de genes, sendo alguns de cópia única, sequências de microssatélites ou elementos transponíveis (TEs). No entanto, nenhum gene relacionado à cascata de diferenciação sexual pôde ser notado. Por fim, as sequências identificadas como repetitivas foram consultadas no banco de dados CENSOR contra a Repbase, tendo apresentando similaridade com diferentes classes de TEs (Tabela 4). De fato, um estudo das sequências presentes nos cromossomos sexuais de linguado através do sequenciamento do genoma indicam que o acúmulo de TEs nos cromossomos sexuais parecem atuar como um dos eventos iniciais para a diferenciação destes cromossomos (Chen et al. 2014). Notavelmente, o *locus* “85444”, exclusivo de fêmeas, mostrou uma alta similaridade com o gene *Foxl2*, conhecido por desempenhar um papel importante na determinação sexual de fêmeas (Baron et al. 2005; Ashida et al. 2013). Nesse sentido, análises mais significativas nesta região deverão ser realizadas.

No presente trabalho, 26 *loci* fêmea-específicos foram triados *in silico* e 13 pares de *primers* foram desenhados para estas regiões para amplificação em reações de PCR. Até o presente momento foram realizadas amplificações de 6 pares de *primers* (Tabela 5) em DNAs de 9 machos e 10 fêmeas e os resultados obtidos confirmaram o caráter diagnóstico destes marcadores em relação ao sexo (Figura 4). Consultando a literatura, é possível verificar que

são raros os trabalhos que aplicaram a metodologia de RAD-seq para identificar marcadores sexo-específicos utilizando dados populacionais e sem precisar construir mapas de ligação a partir de experimentos de cruzamentos. No caso dos peixes, trabalhos recentes com tilápia, salmão e halibute descrevem a identificação de marcadores sexo-específicos nestas famílias, confirmando em parte resultados prévios para outros marcadores já localizados no mapa genético (revisão em Martinez et al. 2014). Neste sentido, um exemplo interessante é descrito em uma espécie de lagarto, com um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY onde, além de detectar e validar um marcador sexo-específico para machos, os autores também testaram este marcador em espécies congêneres e relataram sua característica conservada em espécies próximas (Gamble & Zarkower 2014).

Por outro lado, estudos em diferentes espécies de peixes têm revelado que os marcadores sexo-específicos encontrados em uma espécie geralmente não são identificados em espécies próximas, o que provavelmente estaria ligado à natureza dinâmica deste tipo de marcador ou à sua possível origem independente (Iturra et al. 1997; Chen et al. 2009; Marques et al. 2012). No caso do presente estudo, os cromossomos Z e W de *C. gomesi* estão em um estágio avançado de diferenciação (Pansonato-Alves et al. 2011), o que poderia estar relacionado ao grande número de marcadores moleculares sexo-específicos encontrados nesta análise. Nesse sentido, destaca-se que o teste de *primers* adicionais em *C. gomesi*, bem como o teste em espécies congêneres são importantes para investigar a conservação destes polimorfismos, bem como para interpretar os mecanismos evolutivos envolvidos na determinação do sexo no gênero *Characidium*. Ainda, a busca por marcadores deste tipo nas espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos visíveis são de extrema importância para identificar os mecanismos de determinação do sexo atuantes neste gênero.

Os dados obtidos neste estudo, embora constituam ainda resultados preliminares, permitiram a identificação de marcadores sexo-específicos e a análise específica de alguns deles. Considera-se, pois, que os resultados obtidos aqui serão importantes para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução do processo de determinação do sexo nos componentes do gênero *Characidium*, fornecendo indicações sobre as diferenças que a condição presença ou ausência de cromossomos heteromórficos sexuais poderia resultar nos representantes deste gênero. Além disso, estes marcadores sexo-específicos poderão ser usados como sondas para avaliar mediante hibridação *in situ* sua possível localização cromossômica. Finalmente, a amplificação destes marcadores utilizando DNA dos cromossomos sexuais Z e W microdissecados poderia se tornar uma ferramenta interessante para a determinação da

localização destes marcadores nestes cromossomos, abrindo um campo de possibilidades no estudo da estrutura destes elementos genômicos e da sua função.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
38879_69	2	17	0.235	0.371	1	16	0.000	0.000	0.197	0,00527	22
23581_62	2	16	0.625	0.444	2	19	0.474	0.462	0.195	0,00756	2; 6; 7
30946_43a	2	15	0.067	0.370	1	16	0.000	0.000	0.192	0,00425	3
30946_43b	2	15	0.067	0.370	1	16	0.000	0.000	0.192	0,00425	3
17552_28	2	15	0.267	0.460	2	17	0.118	0.114	0.186	0,0087	7; 10
21967_56	2	18	0.000	0.489	2	18	0.056	0.157	0.186	0,00475	-
79075_29	1	16	0.000	0.000	2	17	0.412	0.337	0.182	0,01145	16
54904_46	2	14	0.143	0.254	2	15	0.400	0.515	0.182	0,01072	14; 21
36403_21	2	18	0.389	0.322	1	19	0.000	0.000	0.181	0,00455	Multiple
79258_9	2	18	0.111	0.356	1	17	0.000	0.000	0.178	0,00538	Multiple
18448_77	2	18	0.222	0.203	2	19	0.579	0.491	0.172	0,00729	9
34672_41	2	17	0.529	0.508	2	15	0.333	0.370	0.171	0,01135	13
69286_35	2	18	0.444	0.489	2	19	0.579	0.422	0.170	0,00927	Multiple
44707_38	2	18	0.611	0.475	2	19	0.421	0.444	0.170	0,0104	9; 14
68628_70	2	17	0.412	0.451	2	16	0.125	0.121	0.168	0,01199	2; 16; 21
11691_48	2	17	0.059	0.059	2	15	0.133	0.405	0.167	0,00961	-
26786_90	2	18	0.222	0.203	2	19	0.368	0.491	0.165	0,00716	3; 10
24411_17a	1	17	0.000	0.000	2	19	0.105	0.341	0.162	0,00589	2; 6; 11
24411_17b	1	17	0.000	0.000	2	19	0.105	0.341	0.162	0,00589	2; 6; 11
76707_48	2	17	0.353	0.299	1	18	0.000	0.000	0.161	0,00966	-
59864_80	2	18	0.611	0.513	2	18	0.333	0.356	0.160	0,01437	-
1030_61a	2	15	0.400	0.497	2	17	0.118	0.214	0.158	0,02031	-
1030_61b	2	15	0.400	0.497	2	17	0.118	0.214	0.158	0,02031	-
1030_61c	2	15	0.400	0.497	2	17	0.118	0.214	0.158	0,02031	-
65705_56	2	16	0.375	0.444	2	16	0.125	0.121	0.157	0,02237	-

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
27823_52	2	14	0.071	0.304	2	15	0.200	0.517	0.156	0,01341	5
52930_72	2	18	0.278	0.322	2	16	0.250	0.516	0.155	0,01079	
8459_59	2	18	0.556	0.413	2	19	0.105	0.102	0.154	0,0112	-
78885_8	2	16	0.000	0.484	2	17	0.235	0.428	0.154	0,01304	7
35757_22	2	18	0.278	0.246	2	19	0.421	0.501	0.154	0,0095	10; 15
34197_58	2	18	0.056	0.056	2	19	0.474	0.371	0.154	0,0142	Multiple
59464_70	1	17	0.000	0.000	2	15	0.333	0.287	0.154	0,01871	-
24152_7	2	18	0.444	0.489	2	17	0.235	0.214	0.150	0,01358	1; 17; 22
6353_10	2	18	0.222	0.457	2	19	0.158	0.149	0.150	0,00859	-
100735_24	2	16	0.250	0.315	1	15	0.000	0.000	0.149	0,02436	Multiple
65421_85	1	18	0.000	0.000	2	18	0.333	0.286	0.147	0,02492	Multiple
8413_21	2	18	0.556	0.489	2	18	0.278	0.437	0.146	0,01741	-
8527_10	2	16	0.375	0.387	2	15	0.067	0.067	0.144	0,02675	-
4796_41	2	14	0.071	0.452	2	15	0.133	0.129	0.142	0,01857	-
26555_48	2	18	0.222	0.286	1	19	0.000	0.000	0.142	0,01053	-
48538_92	2	18	0.222	0.286	1	19	0.000	0.000	0.142	0,01079	-
26250_81a	2	18	0.444	0.413	2	19	0.316	0.501	0.142	0,0104	Multiple
26250_81b	2	18	0.444	0.413	2	19	0.316	0.501	0.142	0,0104	Multiple
1095_37	2	15	0.333	0.480	2	15	0.067	0.186	0.140	0,03078	-
48986_35a	2	18	0.278	0.500	2	15	0.133	0.239	0.140	0,01483	-
48986_35b	2	18	0.278	0.500	2	15	0.133	0.239	0.140	0,01483	-
18705_24	2	15	0.333	0.370	2	17	0.471	0.513	0.139	0,02227	9
36222_92	2	14	0.214	0.198	2	15	0.467	0.480	0.139	0,03052	Multiple
26873_26	2	17	0.529	0.508	2	18	0.222	0.286	0.139	0,01861	-
50961_54a	2	16	0.250	0.315	2	18	0.500	0.513	0.138	0,01892	15

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
50961_54b	2	16	0.250	0.315	2	18	0.500	0.513	0.138	0,01892	15
50961_54c	2	16	0.250	0.315	2	18	0.500	0.513	0.138	0,01892	15
53740_53	1	18	0.000	0.000	2	18	0.222	0.286	0.137	0,02547	20
30988_44	2	18	0.389	0.500	2	19	0.474	0.422	0.137	0,01849	2
46676_6	2	16	0.313	0.498	2	15	0.267	0.239	0.137	0,02282	
76593_46	2	17	0.412	0.401	2	19	0.105	0.102	0.136	0,02052	Multiple
58845_47	2	14	0.214	0.495	2	15	0.467	0.434	0.136	0,03346	13; 20
19674_47	2	17	0.059	0.166	2	16	0.188	0.466	0.136	0,01562	9; 15; 20; 24
62106_40	2	17	0.235	0.371	2	17	0.059	0.059	0.135	0,02742	-
12524_11	2	17	0.353	0.371	2	16	0.063	0.063	0.135	0,02687	-
41983_90	1	15	0.000	0.000	2	17	0.235	0.299	0.135	0,02625	-
51495_91	1	18	0.000	0.000	2	19	0.316	0.273	0.135	0,02551	Highly Multiple
65155_53	1	18	0.000	0.000	2	19	0.316	0.273	0.135	0,02582	-
70498_82	1	18	0.000	0.000	2	19	0.316	0.273	0.135	0,02524	Multiple
57530_38	2	17	0.059	0.059	2	19	0.263	0.371	0.135	0,01421	-
54627_59	2	18	0.333	0.457	2	17	0.176	0.166	0.134	0,01967	-
44656_57	2	17	0.294	0.258	1	19	0.000	0.000	0.134	0,02011	6
18013_8	1	15	0.000	0.000	2	18	0.333	0.286	0.133	0,02855	-
70177_81	2	17	0.176	0.401	2	17	0.529	0.508	0.133	0,02553	-
72496_82	2	18	0.111	0.286	1	19	0.000	0.000	0.133	0,01111	-
63105_61	1	18	0.000	0.000	2	16	0.188	0.272	0.131	0,01919	-
32873_47a	1	17	0.000	0.000	2	19	0.316	0.273	0.130	0,02654	-
32873_47b	1	17	0.000	0.000	2	19	0.316	0.273	0.130	0,02654	-
75202_27	2	18	0.167	0.157	2	19	0.421	0.444	0.130	0,01952	13
46064_28	2	14	0.429	0.349	2	16	0.375	0.516	0.130	0,03248	6

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
58498_47	1	18	0.000	0.000	2	17	0.294	0.258	0.129	0,02285	15
8578_89	2	16	0.125	0.121	2	16	0.438	0.417	0.129	0,04372	-
37137_56	2	16	0.438	0.466	2	15	0.200	0.186	0.128	0,03217	-
58438_49	2	18	0.222	0.286	1	16	0.000	0.000	0.127	0,02603	Multiple
35449_64a	2	17	0.000	0.114	2	18	0.444	0.413	0.127	0,02297	17; 20
35449_64b	2	17	0.000	0.114	2	18	0.444	0.413	0.127	0,02297	17; 20
68486_43a	2	18	0.278	0.386	2	17	0.588	0.513	0.126	0,02571	5; 23
68486_43b	2	18	0.278	0.386	2	17	0.588	0.513	0.126	0,02571	5; 23
39057_21	2	16	0.188	0.272	1	17	0.000	0.000	0.125	0,02207	-
18952_88	2	18	0.611	0.437	2	18	0.500	0.500	0.125	0,03178	11
1278_50	1	18	0.000	0.000	2	19	0.211	0.273	0.125	0,02512	17
55367_20a	1	18	0.000	0.000	2	19	0.211	0.273	0.125	0,0255	Multiple
55367_20b	1	18	0.000	0.000	2	19	0.211	0.273	0.125	0,0255	Multiple
53679_46	2	18	0.167	0.322	2	18	0.278	0.513	0.124	0,02377	-
45679_65	2	17	0.353	0.471	2	17	0.235	0.471	0.124	0,0282	2; 10; 22
46396_21	2	18	0.556	0.457	2	19	0.211	0.193	0.123	0,02471	-
29833_22	2	18	0.500	0.500	2	16	0.188	0.272	0.122	0,0311	15
59955_23	2	18	0.278	0.246	1	19	0.000	0.000	0.122	0,02386	-
30694_40a	2	15	0.000	0.405	2	19	0.105	0.102	0.121	0,03381	Multiple
30694_40b	2	15	0.000	0.405	2	19	0.105	0.102	0.121	0,03381	Multiple
24497_35	2	14	0.357	0.495	2	15	0.133	0.239	0.121	0,03582	3; 5; 21; 22
47643_50	1	17	0.000	0.000	2	19	0.211	0.273	0.121	0,02598	Multiple
64910_38	2	17	0.471	0.471	2	18	0.278	0.475	0.121	0,02954	-
20758_65	2	17	0.471	0.513	2	17	0.412	0.337	0.120	0,04033	12
51335_36a	2	18	0.389	0.437	2	18	0.167	0.157	0.120	0,03516	17

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
51335_36b	2	18	0.389	0.437	2	18	0.167	0.157	0.120	0,03516	17
55231_61a	2	17	0.118	0.114	2	17	0.412	0.401	0.120	0,04387	Highly Multiple
55231_61b	2	17	0.118	0.114	2	17	0.412	0.401	0.120	0,04387	Highly Multiple
29137_34	2	18	0.056	0.056	2	19	0.316	0.341	0.120	0,028	-
31126_20a	2	15	0.400	0.515	2	16	0.250	0.387	0.119	0,03655	14; 17
31126_20b	2	15	0.400	0.515	2	16	0.250	0.387	0.119	0,03655	14; 17
54718_69a	2	18	0.111	0.108	2	19	0.316	0.398	0.119	0,02477	Multiple
54718_69b	2	18	0.111	0.108	2	19	0.316	0.398	0.119	0,02477	Multiple
13059_77a	2	17	0.000	0.299	1	16	0.000	0.000	0.119	0,02514	-
13059_77b	2	17	0.000	0.299	1	16	0.000	0.000	0.119	0,02514	-
61217_78	1	18	0.000	0.000	2	17	0.176	0.258	0.117	0,02309	-
40423_11	2	18	0.167	0.386	2	19	0.421	0.512	0,1161	0,01898	25
75020_33	2	18	0.056	0.056	2	17	0.294	0.337	0.117	0,02577	-
20105_81	2	16	0.438	0.514	2	15	0.267	0.331	0.116	0,03377	-
34405_19	1	18	0.000	0.000	2	19	0.105	0.273	0.116	0,02613	Multiple
18471_55	2	17	0.176	0.166	2	18	0.500	0.437	0.115	0,03417	-
27942_21	2	17	0.471	0.513	2	19	0.316	0.341	0.115	0,02656	-
73694_90	2	15	0.200	0.434	2	16	0.188	0.498	0.115	0,02391	-
64144_83	2	18	0.111	0.108	2	19	0.211	0.398	0.114	0,02466	13
71128_59	2	15	0.400	0.460	2	18	0.444	0.489	0.113	0,02814	Multiple
53364_56	2	17	0.471	0.428	2	17	0.647	0.508	0.113	0,0484	24
10743_35	2	17	0.176	0.337	2	17	0.471	0.513	0.113	0,0386	-
56517_85	2	16	0.063	0.272	1	17	0.000	0.000	0.113	0,02273	Multiple
68916_86	2	17	0.588	0.499	2	18	0.222	0.286	0.112	0,03352	-
24251_62a	2	17	0.059	0.258	2	15	0.400	0.497	0.112	0,02616	Multiple

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
24251_62b	2	17	0.059	0.258	2	15	0.400	0.497	0.112	0,02616	Multiple
24502_49	2	18	0.556	0.489	2	17	0.176	0.258	0.112	0,0319	16
29064_83	2	18	0.500	0.475	2	19	0.263	0.235	0.111	0,03066	Multiple
34050_36	2	18	0.278	0.475	2	18	0.389	0.475	0.111	0,03447	7
12341_44	2	18	0.278	0.246	2	15	0.600	0.480	0.110	0,04341	2
3252_71	2	18	0.167	0.246	1	19	0.000	0.000	0.110	0,02364	1
28108_77	2	18	0.167	0.246	1	19	0.000	0.000	0.110	0,02345	Multiple
64512_61	2	15	0.133	0.405	2	17	0.118	0.114	0.109	0,03645	-
86638_43	2	16	0.063	0.063	2	15	0.400	0.331	0.109	0,04974	Highly Multiple
10615_91a	2	18	0.167	0.246	2	17	0.294	0.487	0.109	0,02914	4
10615_91b	2	18	0.167	0.246	2	17	0.294	0.487	0.109	0,02914	4
37394_65	2	17	0.353	0.428	2	18	0.167	0.157	0.109	0,03183	Multiple
41717_8	2	18	0.167	0.386	2	19	0.105	0.102	0.108	0,02246	-
21089_8a	2	18	0.444	0.489	2	17	0.176	0.258	0.108	0,03079	Multiple
21089_8b	2	18	0.444	0.489	2	17	0.176	0.258	0.108	0,03079	Multiple
31070_79a	2	14	0.214	0.516	2	15	0.400	0.331	0.108	0,04953	14
31070_79b	2	14	0.214	0.516	2	15	0.400	0.331	0.108	0,04953	14
31070_79c	2	14	0.214	0.516	2	15	0.400	0.331	0.108	0,04953	14
35342_60	2	16	0.375	0.484	2	17	0.471	0.471	0.108	0,04593	-
25184_81	2	17	0.235	0.428	2	19	0.053	0.149	0.107	0,02987	-
30161_19	2	18	0.111	0.108	2	16	0.250	0.387	0.107	0,03762	-
36294_17	2	14	0.000	0.349	2	16	0.125	0.516	0.106	0,0325	-
41065_80	2	18	0.278	0.386	2	18	0.111	0.108	0.106	0,04652	Multiple
30170_67	2	17	0.471	0.428	2	17	0.412	0.508	0.106	0,04839	Multiple
30984_42	2	17	0.353	0.513	2	17	0.412	0.401	0.106	0,04551	-

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
69973_20	2	18	0.444	0.508	2	19	0.263	0.422	0.105	0,03389	-
31277_50	2	16	0.250	0.444	2	17	0.353	0.499	0.105	0,02812	-
58705_83	2	18	0.333	0.457	2	18	0.222	0.203	0.104	0,04597	-
38458_14	2	16	0.250	0.226	1	17	0.000	0.000	0.104	0,04938	-
45755_42a	1	17	0.000	0.000	2	16	0.250	0.226	0.104	0,0493	Multiple
45755_42b	1	17	0.000	0.000	2	16	0.250	0.226	0.104	0,0493	Multiple
57002_19a	2	17	0.471	0.513	2	19	0.105	0.398	0.104	0,03056	-
57002_19b	2	17	0.471	0.513	2	19	0.105	0.398	0.104	0,03056	-
31698_61	2	18	0.167	0.157	2	19	0.368	0.422	0.103	0,03714	-
40132_21	2	18	0.167	0.157	2	19	0.368	0.422	0.103	0,03655	Multiple
42028_47a	2	18	0.111	0.108	2	19	0.474	0.371	0.103	0,04654	7; 9; 12
42028_47b	2	18	0.111	0.108	2	19	0.474	0.371	0.103	0,04654	7; 9; 12
43460_38	2	16	0.125	0.226	2	15	0.200	0.480	0.103	0,03787	-
60726_71a	2	18	0.056	0.056	2	17	0.059	0.337	0.101	0,02593	Multiple
60726_71b	2	18	0.056	0.056	2	17	0.059	0.337	0.101	0,02593	Multiple
70186_61	2	17	0.235	0.214	1	19	0.000	0.000	0.101	0,04494	-
53026_25	2	17	0.294	0.451	2	15	0.200	0.186	0.101	0,0385	Multiple
11870_46	2	16	0.375	0.315	2	17	0.059	0.059	0.101	0,04996	-
35134_77	1	17	0.000	0.000	2	19	0.000	0.273	0.101	0,02598	7; 17
33279_34	1	17	0.000	0.000	2	15	0.133	0.239	0.100	0,04422	20
58638_74	2	17	0.176	0.258	2	18	0.222	0.489	0.100	0,03142	Multiple
61196_39a	2	18	0.056	0.246	1	19	0.000	0.000	0.099	0,02322	Highly Multiple
61196_39b	2	18	0.056	0.246	1	19	0.000	0.000	0.099	0,02322	Highly Multiple
4151_64	2	16	0.125	0.121	2	17	0.176	0.401	0.098	0,04533	Multiple
55092_62	2	16	0.438	0.466	2	19	0.368	0.491	0.098	0,03396	7

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
98856_34	2	16	0.125	0.226	2	15	0.067	0.480	0.097	0,03787	17
50877_71	2	18	0.278	0.500	2	17	0.353	0.299	0.097	0,03736	6
38854_85	2	18	0.444	0.356	2	19	0.105	0.102	0.096	0,04327	24
47634_36	2	18	0.444	0.356	2	19	0.105	0.102	0.096	0,04448	-
78260_36	2	18	0.167	0.246	2	19	0.316	0.478	0.096	0,03223	19
32811_21a	2	18	0.500	0.437	2	19	0.211	0.193	0.096	0,04425	-
32811_21b	2	18	0.500	0.437	2	19	0.211	0.193	0.096	0,04425	-
9303_36	2	18	0.444	0.413	2	19	0.421	0.512	0.094	0,03635	-
27191_90	2	18	0.167	0.157	2	19	0.158	0.422	0.094	0,03575	-
17417_71	2	17	0.235	0.214	2	18	0.333	0.457	0.094	0,04566	21
11190_31	2	18	0.333	0.286	2	19	0.368	0.491	0.093	0,04018	-
41061_21	2	18	0.444	0.457	2	19	0.632	0.501	0.093	0,03898	-
26077_39	2	17	0.000	0.428	2	16	0.375	0.508	0.093	0,04536	-
29357_30	2	18	0.500	0.500	2	19	0.158	0.309	0.092	0,04125	-
21243_67a	2	18	0.111	0.108	2	19	0.263	0.371	0.092	0,0474	13
21243_67b	2	18	0.111	0.108	2	19	0.263	0.371	0.092	0,0474	13
21243_67c	2	18	0.111	0.108	2	19	0.263	0.371	0.092	0,0474	13
63252_37	2	17	0.118	0.114	2	18	0.167	0.386	0.092	0,04671	Multiple
73152_92	2	17	0.000	0.114	2	18	0.278	0.386	0.092	0,04621	-
33420_14	2	16	0.250	0.387	2	18	0.444	0.514	0.091	0,04671	7
42232_15	2	18	0.111	0.108	2	17	0.235	0.371	0.091	0,04254	18
66766_11	2	18	0.333	0.356	2	19	0.105	0.102	0.090	0,04367	-
17868_68	2	18	0.278	0.386	2	16	0.125	0.121	0.089	0,04878	-
67581_38	2	18	0.222	0.413	2	19	0.421	0.512	0.088	0,03489	Multiple
8676_82a	2	14	0.143	0.423	2	18	0.056	0.157	0.086	0,04692	Multiple

Cont. Tabela 1	FÊMEAS				MACHOS						Subject id - <i>Danio rerio</i>
Locus id	k	N	HObs	HExp	k	N	HObs	HExp	Fst	P<0.05	
8676_82b	2	14	0.143	0.423	2	18	0.056	0.157	0.086	0,04692	Multiple
65571_71	2	18	0.278	0.322	2	19	0.421	0.501	0.084	0,04751	Multiple
37063_83	2	18	0.222	0.356	2	19	0.684	0.508	0.084	0,04897	-
77119_91	2	18	0.222	0.356	2	19	0.105	0.102	0.084	0,04354	Multiple
8180_40	2	15	0.000	0.239	1	17	0.000	0.000	0.083	0,04274	-
53139_40	1	17	0.000	0.000	2	15	0.000	0.239	0.083	0,04316	7
47228_46	2	18	0.111	0.203	2	19	0.316	0.444	0.083	0,04734	-
53158_84	1	18	0.000	0.000	2	17	0.118	0.214	0.082	0,04976	Multiple
55407_35	2	17	0.176	0.337	2	18	0.222	0.508	0.081	0,0425	13
64179_32	2	15	0.000	0.239	1	16	0.000	0.000	0.078	0,0491	Multiple
79017_83	2	18	0.111	0.203	1	19	0.000	0.000	0.077	0,04991	17
49752_11	1	17	0.000	0.000	2	16	0.000	0.226	0.072	0,04898	Highly Multiple
7498_7	1	18	0.000	0.000	2	17	0.000	0.214	0.067	0,04973	2; 9

Tabela 2: Informações dos 26 *loci* fêmea-específicos. LGs – *Danio rerio*: quais os LGs de zebrafish que contêm os referidos *loci*; NCBI – Blastn: Resultados da busca por similaridade no bando de dados do NCBI e as respectivas coberturas e homologias obtidas para cada sequência.

<i>Locus Id</i>	LGs - <i>Danio rerio</i>	NCBI - Blastn	<i>e-value</i>	Cobertura	Homologia
101094	16; 21				
101507	Múltiplo (+ de 4)	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive	7,00E-18	33%	72%
81510	Múltiplo (+ de 4)	organic solute transporter subunit alpha-like	1,00E-21	30%	74%
85444	Múltiplo (+ de 4)	Foxl2-like protein (Foxl2) gene	2,00E-51	86%	71%
88351	6; 7; 19				
88609	2; 5; 13; Zv9_scaffold3534				
88811	Múltiplo (+ de 4)	ATP-dependent RNA helicase DDX4	1,00E-22	20%	83%
89556	Múltiplo (+ de 4)				
89998	Múltiplo (+ de 4)				
90152	10; 11				
94448	Múltiplo (+ de 4)				
95340	Múltiplo (+ de 4)				
96479	20	neurexin-3b-like	1,00E-08	12%	82%
96801	22	solute carrier family 22 member 13-like	1,00E-66	64%	85%
80994	-				
81572	-				
82018	-	OMA1 zinc metallopeptidase (oma1)	1,00E-33	31%	78%
82070	-				
83737	-	V-type proton ATPase subunit S1-like	3,00E-54	33%	86%
85014	-	F-reticulon 4 gene, partial cds	3,00E-17	31	73
85208	-				
89154	-				
94645	-	histamine receptor H2 (HRH2)	2,00E-06	6%	95%
96133	-				
97419	-				
98767	-				

Tabela 3: Informações dos 26 *loci* fêmea-específicos. LGs – *Danio rerio*: quais os LGs de zebrafish que contêm os referidos *loci*; NCBI – Blastx: Resultados da busca por similaridade no bando de dados do NCBI e as respectivas coberturas e homologias obtidas para cada sequência.

Locus Id	LGs - <i>Danio rerio</i>	NCBI - Blastx	e-value	Cobertura	Homologia
101094	16; 21				
101507	Múltiplo (+ de 4)	-			
81510	Múltiplo (+ de 4)	-			
85444	Múltiplo (+ de 4)	-			
88351	6; 7; 19	pol-like protein [<i>Danio rerio</i>]	6,00E-12	39%	65%
88609	2; 5; 13; Zv9_scaffold3534	pol-like protein [<i>T. nigroviridis</i>]	1,00E-34	81%	48%
88811	Múltiplo (+ de 4)	-			
89556	Múltiplo (+ de 4)		5,00E-28	97%	40%
89998	Múltiplo (+ de 4)	extracellular calcium-sensing receptor-like	4,00E-13	64%	39%
90152	10; 11	-			
94448	Múltiplo (+ de 4)	pol-like protein [<i>T. nigroviridis</i>]	2,00E-27	97%	41%
95340	Múltiplo (+ de 4)				
96479	20	-			
96801	22	solute carrier family 22 member 13-like	9,00E-21	62%	76%
80994	-	-			
81572	-	-			
82018	-	-			
82070	-	-			
83737	-	-			
85014	-	Retrotransposable element Tf2 155 kDa protein type 3	7,00E-09	38%	42%
85208	-	-			
89154	-	-			
94645	-	-			
96133	-	-			
97419	-	-			
98767	-	-			

Tabela 4: Resultados da busca por similaridade das sequências que se apresentaram repetitivas, para os 204 *loci* analisados, através do banco de dados Repbase.

Locus id	Similaridade - Repbase
100735_24	90% de similaridade com o transposon hAT DNA [<i>Danio rerio</i> (hAT-N48_DR)]
36222_92	80% de similaridade com o HE1 SINE elemento [<i>Danio rerio</i> (HE1_DR1)]
70498_82	65% de similaridade com o L2-1 [<i>Danio rerio</i> (L2-1_DR)]
86638_43	75% de similaridade com o Helitron (<i>Danio rerio</i> (Helitron-2_DR)]
60726_71b	89% de similaridade com o UNASINE1 [<i>Anguilla</i> (UnaSINE1)]
61196_39a	88% de similaridade com o TZF28B [<i>Danio rerio</i> (TZF28B)]
49752_11	85% de similaridade com o transposon hAT DNA [<i>Danio rerio</i> (hAT-N37_DR)]

Tabela 5: Conjuntos de *primers* que apresentaram amplificação diferencial entre machos e fêmeas de *Characidum gomesi*.

Locus id	Primer Forward	Primer Reverse
82018	GCAGTGCTGAGAATGATCCA	GCCAAGTGAGGCTCTGTTC
82070	CCTTTAGTGTGGGAGGACCA	TATGTGCATGTGTGCAAAGC
83737	AACCCATTTGTGGCAACTTC	TTTGTGTTGTGATGGCACCT
89154	CCCTCTTCTCTCTGCTCTCC	CTGACTGGTCCTCCATCCAT
94645	AATGAATTAAGCGGGTTTGC	AAAGCCAAACAGCCACACTA
96801	GAGGTTCACTTTCCTCCCATC	TTTAACTTTGGACAGCAGCTCA

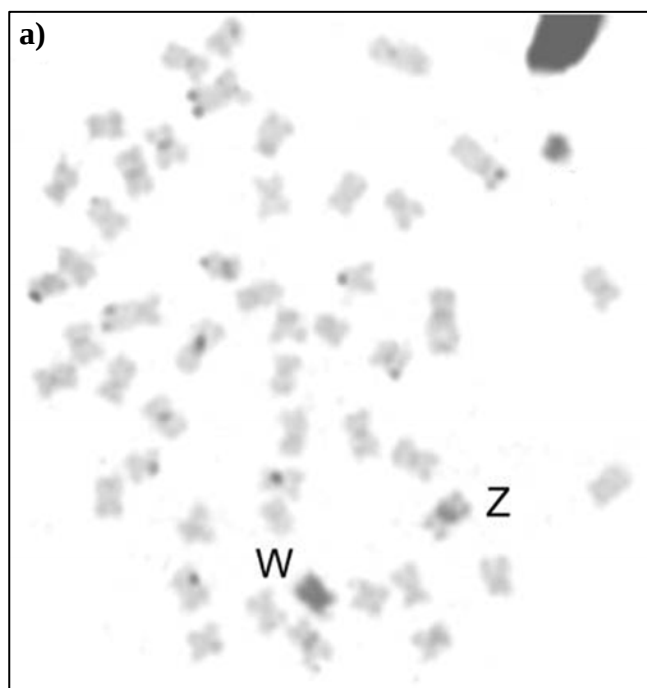


Figura 1: Metáfase de *Characidium gomesi* após bandamento C (a). As letras destacam os cromossomos sexuais Z e W. Em (b) foto de exemplar de *Characidium gomesi* medindo 6,5 cm.

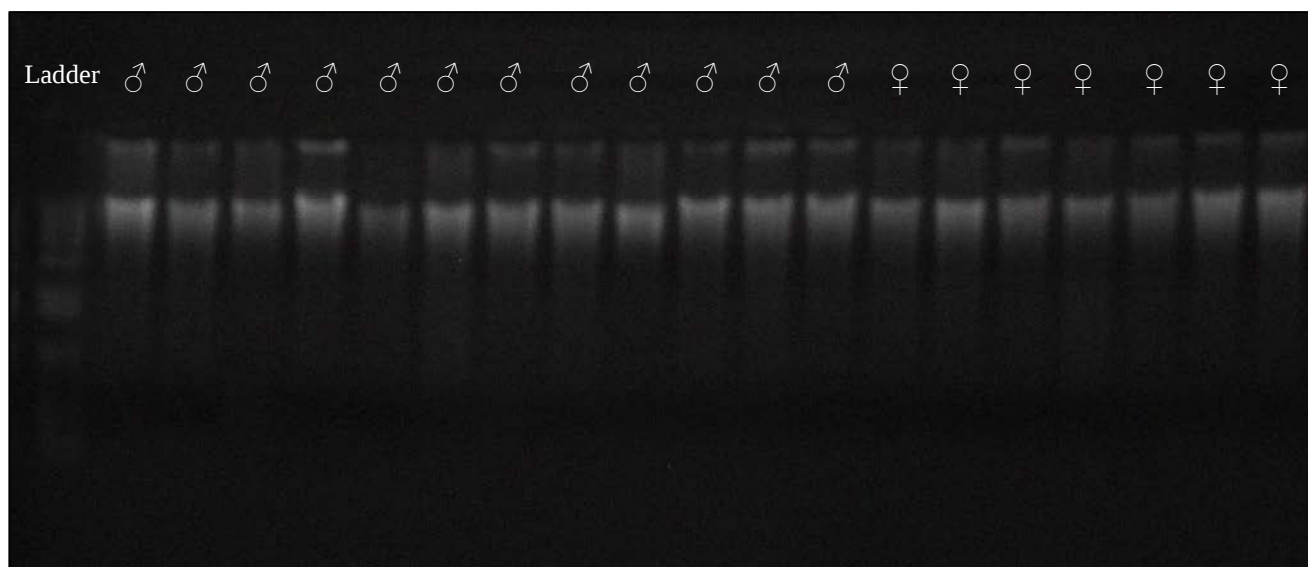


Figura 2: Extração de DNA de alguns exemplares de *C. gomesi* em gel de agarose 1% para a verificação da qualidade da extração.

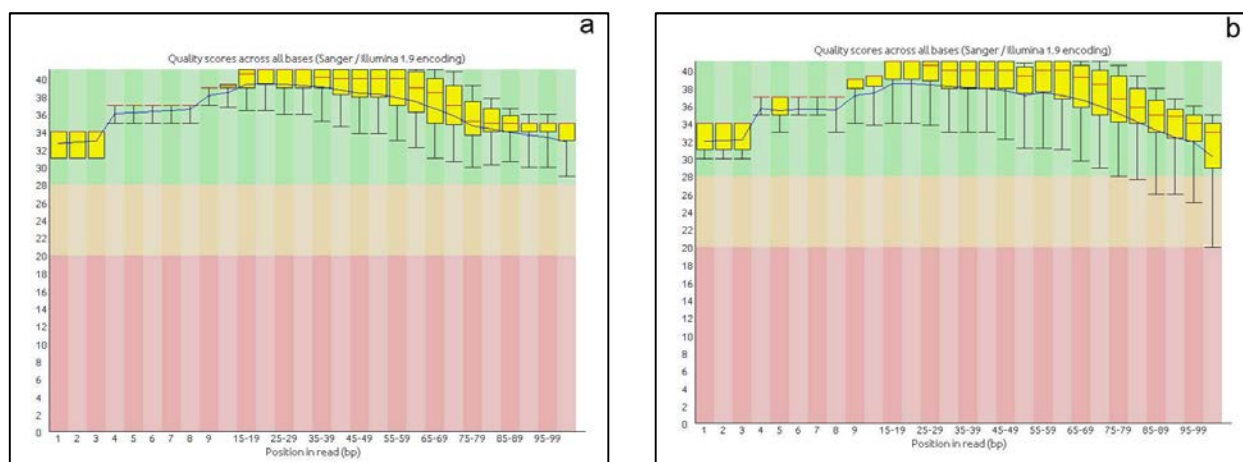


Figura 3: Gráficos representando a qualidade do sequenciamento (media de 37 – medidor de qualidade Phred), sendo o principio e o final das seqüências as zonas de qualidade inferior. Em (a) a qualidade de leitura das bases das seqüências *paired-ends* e em (b) a qualidade da leitura de todas bases.

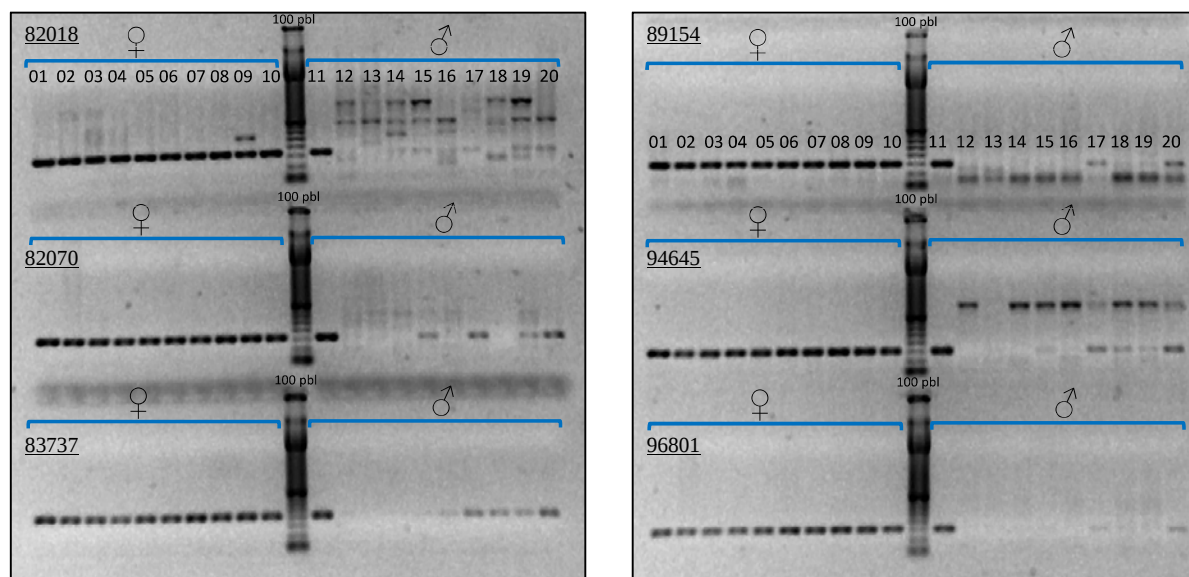


Figura 4: Teste de 6 pares de *primers* fêmea-específicos realizados em amostras de DNA de *Characidium gomesi*. À esquerda gel de agarose com a amplificação em DNA de fêmeas e à direita amplificação em DNA de machos, exceto na amostra número 11. Em destaque o número do primer utilizado (Tabela 5).

5 Considerações Finais

O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu), visando aumentar o conhecimento sobre a composição cariotípica geral e estrutura molecular de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais.

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes espécies do gênero *Characidium* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cariotípica neste grupo. Como já constatado anteriormente, estes peixes apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada com $2n=50$ cromossomos em todas as espécies. No entanto, a ocorrência de cromossomos acrocêntricos em algumas espécies, diversos DNAs repetitivos distribuídos diferencialmente nos cromossomos, cromossomos supranumerários e um sistema de cromossomos sexuais em distintos estágios de diferenciação evidenciam uma extensa diversificação cariotípica neste grupo de peixes.

Embora os dados cariotípicos aqui apresentados sejam de caráter fundamentalmente descritivos, considera-se que eles serão de extrema importância para a elaboração de hipóteses mais conclusivas e fundamentadas sobre diversos aspectos cromossômicos deste grupo, principalmente àquelas que se referem à origem e evolução dos cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais. Embora diversos autores tenham proposto que a origem dos cromossomos sexuais ocorreu uma única vez a partir da separação de *Characidium zebra*, os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto com análises filogenéticas, poderiam sugerir hipóteses secundárias como o surgimento independente de cromossomos sexuais, ou até mesmo o desaparecimento destes cromossomos em *Characidium zebra*. Nesse sentido, destacamos a imprescindível necessidade de uma filogenia robusta para a família Crenuchidae para que seja possível elaborar hipóteses mais conclusivas sobre este tema.

Diante da extensa variedade de cromossomos sexuais e modos de reprodução dos peixes, os estudos relativos à diferenciação sexual nestes organismos têm se tornado cada vez mais frequentes. No entanto, a complexidade dos mecanismos que norteiam esta característica dificultam os estudos desta natureza. Desta forma, a caracterização massiva de marcadores moleculares relacionados ao sexo poderia ser considerada um passo importante para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de determinação sexual e da biologia dos cromossomos sexuais. Nesse sentido, o teste destes marcadores em espécies congêneres com e sem cromossomos sexuais, certamente irá fornecer respostas

importantes sobre a extensão de compatibilidade destes marcadores e sua relação com os cromossomos sexuais, a ocorrência em espécies que não apresentam cromossomos sexuais, além de permitir a investigação do efeito funcional destes polimorfismos nos componentes deste grupo.

Finalmente, deve-se destacar que a continuidade dos estudos apresentados neste trabalho será de fundamental importância para aumentar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica e biologia evolutiva dos peixes Neotropicais.

6 Referências Bibliográficas

- Adegoke JA, Árnason Ú, Widegren B (1993). Sequence organization and evolution, in all extant whalebone whales, of a DNA satellite with terminal chromosome localization. *Chromosoma*, 102(6), 382–388. doi:10.1007/BF00360402
- Albert JS, Crampton WGR, Thorsen DH, Lovejoy NR (2005). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, 2(4), 375–417.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MF, Toledo-Filho SA (2000). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*, 109(3), 197–200.
- Almeida Toledo LF, Foresti F (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111(1-3), 91–100.
- Ashida H, Ueyama N, Kinoshita M, Kobayashi T (2013). Molecular identification and expression of FOXL2 and DMRT1 genes from willow minnow *Gnathopogon caerulescens*. *Reproductive Biology*, 13(4), 317–24.
- Baird N A, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, ... Johnson EA (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3(10), 1–7.
- Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Crihiu E, ... Fellous M (2005). Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction, Nutrition, Development*, 45(3), 377–82.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD, Blaxter ML (2011). Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PloS One*, 6(4), e19315.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8(7), 603–613.
- Blackburn EH, Greider CW (1995). Telomeres. Cold Spring Harbor Laboratory. Press New York.

- Bourgain FM, Katinka MD (1991). Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the *Paramecium primaurelia* macronucleus. *Nucleic Acids Research*, 19(7), 1541–1547.
- Bradley KM, Breyer JP, Melville DB, Broman KW, Knapik EW, Smith JR (2011). An SNP-based linkage map for Zebrafish reveals sex determination loci. *G3 (Bethesda, Md.)*, 1(1), 3–9.
- Buckup PA (1993). The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 108(3), 225–245.
- Buckup PA, Reis RE (1997). Characidiin genus *Characidium* (Teleostei , Characiformes) in southern Brazil, with description of three new species published by: American Society of Ichthyologists and Herpetologists Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1447557> Characidiin Genus. *Copeia*, 1997(3), 531–548.
- Buckup P (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes. In C. Malabarba, LR Reis, RE Vari, RP Lucena (Ed.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp. 123–144). Porto Alegre.
- Buckup PA, Hahn L (2000). *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. *Copeia*, 1:150-155.
- Buckup P (2003). Family Crenuchidae (South America daters). In C. Reis, RE Kullander, SO Ferraris (Ed.), *Ckeck List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (pp. 87–95). Porto Alegre.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PloS One*, 8(6), e66532.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH (2011). Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3 (Bethesda, Md.)*, 1(3), 171–82.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome. *Caryologia*, 54(3), 253–260.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*, 138, 213–218.
- Charlesworth B (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251(4997), 1030–1033.

- Chen SL, Tian YS, Yang JF, Shao CW, Ji XS, Zhai JM, ... Wang N (2009). Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology* (New York, N.Y.), 11(2), 243–51. doi:10.1007/s10126-008-9139-0.
- Chen S, Zhang G, Shao C, Huang Q, Liu G, Zhang P, ... Wang J (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 46(3), 253–60.
- Cioffi MB, Bertollo LAC (2010). 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*, 105(6), 554–61.
- Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132, 289–296.
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012) Review Paper. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, 80: 2125–2139.
- Cole CJ, Leavens C (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol*, 3(6), 102.
- Cuadrado A, Jouve N (2010). Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma*.
- Graça WJ, Pavanelli CS (2008). *Characidium heirmostigmata*, a new characidiin fish (Characiformes: Crenuchidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(1), 53–56.
- Da Silva EM, Wong MSL, Martins C, Wasko AP (2012). Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinhã, *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(5), 1487–96.
- Devlin RH, Nagahama Y (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191–364.
- Dover GA (1993). Evolution of genetic redundancy for advanced players. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(6), 902–10.
- Drummond AJ, Kearse M, Heled J, Moir, Thierer T, Ashton B, Wilson A and Stones S Havas (2006) Geneious v5.4.2.

- Eschmeyer WN (2015) Catalog of fishes. California Academy of Sciences. *Eletronic version*. Accessed 5 Dezembro de 2014. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/>
- Edgar RC (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113.
- Ellegren H (2011). Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews. Genetics*, 12(3), 157–66.
- Etter PD, Preston JL, Bassham S, Cresko WA, Johnson EA (2011). Local de novo assembly of rad paired-end contigs using short sequencing reads. *PLoS ONE*, 6(4).
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF (2001). A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces: Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. *Caryologia*, 54(1), 23–30.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 31(3), 137–144.
- Gamble T, Zarkower D (2014). Identification of sex-specific molecular markers using restriction site-associated DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 14, 902–913.
- Garrido-Ramos MA, De la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M (1999). A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenetic and Genome Research*, 83(1-2), 3–9.
- Graça, WJ, Pavanelli, CS (2008). *Characidium heirmostigmata*, a new characidiin fish (Characiformes: Crenuchidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6:53-56.
- Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP (2004). Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Research*, 12(2), 143–151.
- Hancock JM (1996). Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 18(5), 421–5.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, ... Strüssmann CA (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2955–9.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1), 55–8.

- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF (2011). Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (Eigenmannia). *Heredity*, 106(2), 391–400.
- Houston RD, Davey JW, Bishop SC, Lowe NR, Mota-Velasco JC, Hamilton A, ... Taggart JB (2012). Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 13(1), 244.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(8), 754–755.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19(17), 4780.
- Iturra P, Medrano JF, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin JC (1997). Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica*, 101(3), 209–13.
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, ... Kikuchi K (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), e1002798.
- Kejnovský E, Michalovova M, Steflava P, Kejnovska I, Manzano S, Hobza R, ... Vyskot B (2013). Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. *PloS One*, 8(1), e45519.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196–6200.
- Koubová M, Pokorná JM, Rovatsos M, Farkačová K, Altmanová M, Kratochvíl L (2014). Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosome Research*, 22(4), 441–52.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, 51(5), 350–6.
- Leitão RP, Buckup PA (2014). A New Species of *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) from Coastal Basins of Serra do Mar, Southeastern Brazil. *Copeia*, 2014(1), 14–22.

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201–220.
- Lin KW, Yan J (2008). Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research*, 658(1-2), 95–110.
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA (1993). Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134(4), 1149–74.
- López-Flores I, Garrido-Ramos M. (2012). The repetitive DNA content in eukaryotic genomes. In M. Garrido-Ramos (Ed.), *Repetitive DNA genome dynamics*, 1–28.
- Lovejoy NR, Lester K, Crampton WGR, Marques FPL, Albert JS (2010). Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 278–90.
- Lucinda PHF (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3(2), 259–270.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, ... Vicari M R (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics*, 12(1), 65.
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F (2004). Cytogenetic Analysis of B-chromosomes and ZZ/ZW Sex Chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *CYTOLOGIA*, 69(2), 181–186.
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F (1998). Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*, 104, 1–7.
- Manchado M, Zuasti E, Cross I, Merlo A, Infante C, Rebordinos L (2006). Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome*, 49(1), 79–86.
- Mank JE, Promislow DEL, Avise JC (2006). Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(1), 83–93.
- Marshall OJ (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20: 2471–72.

- Martínez P, Viñas AM, Sánchez L, Díaz N, Ribas L, Piferrer F (2014). Genetic architecture of sex determination in fish : applications to sex ratio control in aquaculture. *Frontiers in genetics* 5 , 1–13.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, ... Sakaizumi M (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559–63.
- McMurray CT (1995). Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma*, 104(1), 2–13.
- Melo MRS, Buckup PA (2002). *Characidium stigmatosum* (Characiformes: Crenuchidae): A new species of Characidiin fish from central Brazil. *Copeia* 2002(4), 988–993.
- Merlo MA, Cross I, Chairi H, Manchado M, Rebordino L (2010). Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes & Genetic Systems*, 85(5), 341–9.
- Metcalfe CJ, Eldridge MDB, Johnston PG (2004). 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*, 12(4), 405–14.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 7049–7053.
- Milani D, Cabral-de-Mello DC (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: Remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS ONE*, 9(5), 1–6.
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PCM., ... Nagamachi CY (2013). Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). *PLoS ONE*, 8(2), 1–6.
- Miyazawa CS, Galetti PM (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia*, 59(1), 73–79.
- Muhmann-Diaz M, Cristian AT, Bedford J (1995). Chromosome Microdissection. *Radiation Research* 2, 2, 468–469.
- Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, ... Sakaizumi M (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163–70.

- Nanda IF, Steinlein CM, Schmid M (2009). Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3-4), 396–400.
- Nergadze SG, Santagostino MA, Salzano A, Mondello C, Giulotto E (2007). Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biology*, 8(12), R260.
- Netto-Ferreira AL, Birindelli JLO, Buckup PA (2013). A new miniature species of *Characidium* reinhardt (Ostariophysi: Characiformes: Crenuchidae) from the headwaters of the rio Araguaia, Brazil. *Zootaxa*, 3664(May), 361–368.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138(3), 343–354.
- Noletto RB, Amorim AP, Vicari MR, Arttoni RF, Cestari MM (2009). An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*, 75, 448–453.
- Ocalewicz K (2013). Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3), 114–25.
- Ocalewicz K, Furgala-Selezniow G, Szmyt M, Lisboa R, Kucinski M, Lejk AM, Jankun M (2013). Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. *Genetica*, 141(10-12), 409–16.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007). Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, & B. Kapoor (Eds.), *Fish Cytogenetics* (pp. 111–164). Enfield: Science Publisher, Inc.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. (1988) Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista brasileira de Genética*, 11, 577-624.
- Oliveira C, Wright JM (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6(3), 205–11.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 81–100.
- Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, ... Corrêa e Castro RM (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 275.

- Pagnozzi, J. M., De Jesus Silva, M. J., & Yonenaga-Yassuda, Y. (2000). Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Research*, 8(7), 585–91.
- Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y (2002). 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? *Cytogenetic and Genome Research*, 98:278–284.
- Palacios-Gimenez OM, Castillo ER, Martí DA, Cabral-de-Mello DC (2013). Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 167.
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010). Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*. 8: 77-86.
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. (2011a). Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 208–213.
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F (2011b). Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*, 78, 183–194.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Silva C, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2014). Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*, *PLoS ONE*, 9(9).
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 116(3), 218–23.
- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Forest F (2013). Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *Genetica*, 141, 1–9.
- Penman DJ, Piferrer F (2008). Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16-34.

- Peixoto LAW, Wosiacki WB (2013). A New Species of *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) from the Lower Amazon. *Copeia*, 2013(1), 52-57.
- Pelliccia F, Barzotti R, Bucciarelli E, Rocchi A (2001). 5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: A new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. *Genome*, 44(3), 331-335.
- Pendás AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vazquez E (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 67(1), 31-36.
- Phillips RB, Reed KM (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140:197-216.
- Piferrer F, Guiguen Y (2008). Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 35-55.
- Piferrer F, Ribas L, Díaz N (2012). Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 14(5), 591-604.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Pokorná M, Kratochvíl L (2009). Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(1), 168-183.
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011). Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics*, 12, 90.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, ... Martins C (2010). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*, 11, 50.
- Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB (2014). Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(1), 40-5.

- Posada D, Crandall KA (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817–8.
- Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Pansonato-Alves JC, ... Vicari MR (2014). Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): Effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111, 541–553.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007a) Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 4 Jan, 2012.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007b) Tree Annotator v1.4.8. <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>. Accessed 4 Jan, 2012.
- Reis RE, Weber C, Malabarba LR (1990). Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with
- Ribeiro AC (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4(2), 225–246.
- Ronquist F, & Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.
- Rousset F (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–6.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E (2008). Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3-4), 219–28.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado A, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD (2014). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*.
- Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO (2003). Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 270(3), 389–403.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Costa-Silva G, Oliveira C, Foresti F (2014). Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of *Characidium* (Teleostei, Characiformes).
- Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida M C, Schühli GS, Artoni RF, ...Vicari MR (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome

- systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica*, 139(2011), 1499–1508.
- Silva JFP (2004). Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 2:55–60.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, ... Foresti F (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141(7-9), 329–36.
- Silva DS, Milhomem SSR, Pieczarka JC, Nagamachi C Y (2009). Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics*, 10, 74.
- Silveira LGG, Langeani F, Graça WJ, Pavanelli CS, Buckup PA (2008). *Characidium xanthopterum* (Ostariophysi: Characiformes: Crenuchidae): a new species from the Central Brazilian Plateau. *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 169–174.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75(1), 304–306.
- Taberlet P, Fumagalli L, Hausser J (1994). Chromosomal Versus Mitochondrial DNA Evolution: Tracking the Evolutionary History of the Southwestern European Populations of the *Sorex araneus* Group (Mammalia, Insectivora). *Evolution*, 48(3), 623–636.
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, ... Nakamura KI (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental Gerontology*, 37(4), 523–531.
- Taphorn BDC, Montaña CG, Buckup P (2006). *Characidium longum* (Characiformes: Crenuchidae), a new fish from Venezuela. *Zootaxa*, 12(May), 1–12.
- Tautz D, Renz M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127–38.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, Passos KB, Feldberg E (2013). Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. *Sexual Development*, 7(6), 325–33.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967–81.

- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2014). Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research*, 142, 286–292.
- Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998). TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell*, 92(3), 401–413.
- Veyrunes F, Britton-Davidian J, Robinson TJ, Calvet E, Denys C, Chevret P (2005). Molecular phylogeny of the African pygmy mice, subgenus *Nannomys* (Rodentia, Murinae, Mus): implications for chromosomal evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(2), 358–69.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a). Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*, 134, 311–317.
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008b). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex: evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 173–179.
- Vicoso B, Charlesworth B (2006). Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 645–53.
- Vicoso B, Bachtrog D (2013). Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature*, 499(7458), 332–5.
- Volobouev VT, Aniskin VM, Lecompte E, Ducroz JF (2002). Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid rodents inferred from the comparison of cytogenetic and molecular data. *Cytogenetic and Genome Research*, 96(1-4), 261–75.
- Wang W, Lan H (2000). Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 17(9), 1326–33.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1847–57.
- White T (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322).
- Xia X (2001). DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity*, 92(4), 371–373.

- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1), 1–7.
- Xia X, Lemey P (2009). The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. *Cambridge University Press*, 615–630.
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, ... Guiguen Y (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology : CB*, 22(15), 1423–8.
- Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486–96.
- Yano A, Nicol B, Jouanno E, Guiguen Y (2014). Heritable Targeted Inactivation of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Master Sex-Determining Gene Using Zinc-Finger Nucleases. *Marine biotechnology*, 16(2), 243-250.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Tripurtheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes, *PLoS ONE* 9(3), 1–7.
- Zarske A, Géry J (2001). Beschreibung von drei neuen Arten der Gattung *Characidium* Reinhardt, 1866 aus Bolivien und Paraguay (Teleostei: Characiformes: Characidiidae). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum Für Tierkunde Dresden*, 51(16), 229–246.
- Zerbino DR, Birney E (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–9.

Versão original do artigo contido na Tese

Capítulo 1: Distribuição intersticial de sequências teloméricas nos cromossomos de *Characidium* (Teleostei, Characiformes)

Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F.

Genetica, versão online (2014)

Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of *Characidium* (Teleostei, Characiformes)

Priscilla Cardim Scacchetti · Ricardo Utsunomia ·
José Carlos Pansonato-Alves · Guilherme José da Costa-Silva ·
Claudio Oliveira · Fausto Foresti

Received: 18 August 2014 / Accepted: 22 December 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract *Characidium* comprises several species of small freshwater fish that display conserved diploid chromosome numbers and karyotypic formulae. In this study, a comparative cytogenetic analysis using telomeric DNA probes was carried out in nine species of *Characidium*; a molecular phylogenetic analysis with mitochondrial DNA was also performed in order to investigate the direction of the evolutionary chromosome changes observed here. Our results showed the existence of species with several and variable interstitial telomeric sites (ITSs), with other species showing only terminal signals in their chromosomes. Molecular phylogenetic data suggested that these ITSs emerged once in the evolutionary history of *Characidium* and were later differentially spread in distinct species/populations of this clade. Additionally, the origin of an exclusive acrocentric pair found in *C. pterostictum*, *C. serrano* and *C. timbuiense* was also investigated, revealing that this pair possibly had a common origin to these species. These results evidence the occurrence of intense and continuous genomic changes among species of *Characidium*.

Keywords Crenuchidae · Fish cytogenetics · mtDNA · Telomeres

Introduction

Telomeres are functional chromosome caps located at the ends of eukaryotic chromosomes (Blackburn and Greider 1995). In general, telomere function is associated with the maintenance of chromosome structure, protecting the chromosomes from end-to-end fusions and degradation (Bourgain and Katinka 1991; Blackburn and Greider 1995; van Steensel et al. 1998). Telomeres are composed of tandem repeat sequences, which can vary significantly in size among species or even among chromosomes of a single individual (Meyne et al. 1989; Takubo et al. 2002; López-Flores and Garrido-Ramos 2012). In vertebrates, these repeats have been identified as the sequence (TTAGGG)_n (Meyne et al. 1989).

Several methods for the assessment of telomere sequences location are available, including fluorescence in situ hybridization (FISH; Saldanha et al. 2003). In fish, the chromosomal mapping of telomeric DNA has been reported for approximately 80 species (Ocalewicz 2013). In general, such studies aimed at characterizing interstitial telomeric sites (ITSs), which are relicts of chromosome rearrangements, such as fusions and/or inversions (Ocalewicz 2013; Ocalewicz et al. 2013). However, these ITSs are not always remnants of chromosomal rearrangements, as evidenced in distinct organisms (Garrido-Ramos et al. 1998; Nanda et al. 2008).

Characidium is a specious fish genus within Crenuchidae and is widely distributed throughout Neotropical rivers (Buckup 2003). Cytogenetic studies in this group have revealed the occurrence of extensive changes on the sub-chromosomal level of resolution, like a substantial diversification of rDNA sites in the within- and between-species level (Vicari et al. 2008a; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Conversely, a remarkable conservation of the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10709-014-9812-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. C. Scacchetti (✉) · R. Utsunomia · J. C. Pansonato-Alves ·
G. J. da Costa-Silva · C. Oliveira · F. Foresti
Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião
Junior, s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil
e-mail: pcardim@hotmail.com; pcardim@ibb.unesp.br

karyotype structure is observed, with all species analyzed to date presenting a diploid number of 50 chromosomes, mainly composed of biarmed chromosomes; an exception is *C. pterostictum* and one unnamed species, which present a single acrocentric pair (Pansonato-Alves et al. 2010; Machado et al. 2011; Pucci et al. 2014). Such karyotype homogeneity indicates that macro-chromosomal rearrangements (e.g. fusion and/or fission) are not the main mechanisms of karyotype diversification in this group, although an active dynamics of repetitive sequences is observed. Remarkably, the cytogenetic analysis of one population of *C. pterostictum* revealed the occurrence of ITSs on several chromosome pairs (Pansonato-Alves, unpublished data).

Pansonato-Alves et al. (2014) highlighted that molecular phylogenetic analyses can be considered excellent complements for cytogenetic studies by unveiling the direction of evolutionary chromosome changes. Although this approach represents a powerful tool to ascertain chromosome homologies (Milhomem et al. 2013) and the origin of particular chromosomes, like sex or supernumerary chromosomes (Pansonato-Alves et al. 2014), this type of analysis is hampered in fish species, mainly because phylogenetic information is not available for many different groups.

Here, we describe the chromosomal location of telomeric repeats in nine different species of *Characidium* to analyze the extent of ITSs occurrence in the chromosomes of representatives of this genus. Our results showed the existence of species with several and variable interstitial telomeric sites (ITSs), with other species showing only terminal signals in their chromosomes. Therefore, we inferred phylogenetic relationships among these species using molecular data to investigate (1) the monophyly of species showing ITSs and (2) the occurrence of a single event responsible for the origin of the acrocentric chromosomes in three species of this genus.

Materials and methods

Sampling

Characidium species were sampled in distinct Brazilian rivers (Table 1). The animals were collected in accordance with Brazilian environmental protection legislation (Collection Permission MMA/IBAMA/SISBIO—number 3245), and the procedures for collection, maintenance and analysis of the fishes were approved (Protocol 595) by the Bioscience Institute/UNESP Ethics Committee on Use of Animals (CEUA). After analysis, all specimens were deposited at the fish collection of Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) at UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil (Table 1).

Mitotic chromosomes, repetitive probes and fluorescent in situ hybridization (FISH) experiments

Cell suspensions and tissues of the species *C. cf. zebra*, *C. gomesi*, *C. lanei*, *C. lauroi* and *C. schubarti* were already available in our laboratory and their karyotypes were described in previous papers (Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, b). In addition, the species *C. vidali*, *C. serrano*, *C. timbuiense* and the two populations of *C. pterostictum* were collected and analyzed for the first time in the present study. Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney tissues, according to Foresti et al. (1981). C-banding was carried out according to Sumner (1972). The chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a) (Levan et al. 1964).

A telomeric DNA probe was generated and labeled with digoxigenin-11-dUTP by polymerase chain reaction (PCR) in the absence of a template DNA using (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅ as primers (Ijdo et al. 1991).

The hybridization conditions were the same for every analyzed sample, and high-stringency conditions were applied following the procedures described in Pinkel et al. (1986). Slides were incubated with RNase (50 µg/ml) for 1 h at 37 °C, and the chromosomal DNA was then denatured in 70 % formamide/2 × SSC for 5 min at 70 °C. For each slide, 30 µl of hybridization solution containing 200 ng of the labeled probe, 50 % formamide, 2 × SSC and 10 % dextran sulfate was denatured for 10 min at 95 °C, dropped onto the slides and hybridized overnight at 37 °C in a 2 × SSC moist chamber. Post-hybridization, the slides were washed in 0.2 × SSC/15 % formamide for 20 min at 42 °C, followed by a second wash in 0.1 × SSC for 15 min at 60 °C and a final wash at room temperature in 4 × SSC/0.5 % Tween for 10 min. Probe detection was carried out using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche). The chromosomes were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories).

Mitochondrial DNA phylogenetic analysis

COI and CytB sequences of the studied *C. gomesi*, *C. schubarti* and *C. lanei* populations were retrieved from GenBank for CytB (GenBank accession numbers KF914671 to KF914692) and COI (GenBank accession numbers KF914693 to KF914710). Additionally, these regions were sequenced for *C. cf. zebra*, *C. vidali*, *C. lauroi*, *C. serrano*, *C. timbuiense*, two populations of *C. pterostictum* (Itapeva Lagoon and Jacuí river) and *Ammocryptocharax elegans* (outgroup). Both genes were PCR amplified from one individual of each species according to standard methods using the following primer pairs: Cytb-

Table 1 *Characidium* species and populations analyzed

Species	Coordinates	Locality	LBP	N	ITS
<i>C. cf. zebra</i>	S 23°30'40 W 45°51'32	Paraitinga River—Salesópolis, SP	8,704	3♀ 1♂	–
<i>C. vidali</i>	S 22°28'51.79" W 42°23'39.06"	Bananeiras Stream—Silva Jardim, RJ	19,039	7♀ 2♂	–
<i>C. gomesi</i>	S 23°01'26 W 48°49'32	Novo River—Avaré, SP	6,377	5♀ 3♂	–
<i>C. pterostictum</i>	S 28°38'43.9"S W 53°33'35.7"	Jacuí River—Cruz Alta, RS	14,672	7♀ 8♂	12
<i>C. pterostictum</i>	S 29°31'009" W 50°05'37.5"	Itapeva Lagoon, Três Forquilhas, RS	14,901	7♀ 2♂	18
<i>C. schubarti</i>	S 25°17'46 W 49°44'56	Cinco Reis River—Jaguariaíva, PR	8,702	2♀ 1♂	6
<i>C. serrano</i>	S 28°08'01.8" W 55°13'56.9"	Canoinha Stream—Between São Nicolau and Pirapó, RJ	19,038	4♀ 2♂	12
<i>C. timbuiense</i>	S 19°58'32.56" W 40°32'53.15"	Valsugana Velha Stream—Santa Teresa, ES	18,475	8♀ 7♂	14
<i>C. lanei</i>	S 25°26'29 W 48°32'28	Cari River—Morretes, PR	8,700	1♀ 2♂	8
<i>C. lauroi</i>	S 23°23'42 W 45°07'17	Grande River—Ubatuba, SP	8,741	1♀ 1♂	10

N number analyzed species, ITS number of ITS-bearing chromosomes

L14841 + Cytb-H15149 (Kocher et al. 1989) and Fish-F1 + FishR1 (Ward et al. 2005). The GenBank accession numbers for these sequences are KM229364–KM229369 (COI) and KM229370–KM229375 (CytB).

Consensus sequences from forward and reverse strands were obtained using Geneious Pro 5.4.2 (Drummond et al. 2006), and alignments were generated using the Muscle algorithm (Edgar 2004) under the default parameters. Sequences from each gene were aligned separately and then concatenated into a single dataset. After the alignments, this dataset was checked by eye for any obvious misalignments or potential cases of sequencing errors. A quality control step was included in our workflow to detect contamination, paralogous copies or pseudogenes. After that, the presence of stop codons was checked using Geneious Pro 5.4.2. To evaluate the occurrence of substitution saturation, we estimated the Iss index with DAMBE 5.2.31 (Xia and Xie 2001), as described by Xia et al. (2003) and Xia and Lemey (2009), and the rate of transitions/transversions was also evaluated using the software DAMBE 5.2.31 (Xia and Xie 2001). The dataset was split into six partitions, each one representing a different codon position of each gene. The best evolutionary model for each partition was estimated with Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998).

Bayesian inference (BI) (Huelsenbeck and Ronquist 2001) was performed to evaluate alternative tree topologies through the estimation of posterior probabilities using MrBayes v.3.0 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Eight chains were run simultaneously for 10,000,000 generations, and a tree was sampled every 100th generation. The above analysis was performed twice. The distribution of log-likelihood scores was examined using the program Tracer 1.5 (Rambaut and Drummond 2007a) to determine the stationary phase for each search and to decide whether

extra runs were required to achieve convergence. All sampled topologies beneath the asymptote (2,500,000 generations) were discarded as part of a burn-in procedure, and the remaining trees were used to construct a 50 % majority-rule consensus tree in TreeAnnotator v1.6.2 (Rambaut and Drummond 2007b).

Results

Karyotype and (TTAGGG)_n sites distribution

All species presented a conserved diploid number of 50 chromosomes, mainly composed of biarmed chromosomes, except for *C. timbuiense*, *C. serrano* and *C. pterostictum*, which each presented one acrocentric pair (Fig. 1). The C-banding technique showed centromeric marks on all chromosomes and evidenced the ZW sex chromosomes in all species, except for *C. cf. zebra* (Fig. 2). Moreover, the acrocentric chromosomes of *C. pterostictum* and *C. serrano* showed evident and polymorphic heterochromatin blocks in the terminal position of the long arms (Fig. 2h, l, p).

FISH analyses with the (TTAGGG)_n probe generated signals in the telomeres of all chromosomes. Remarkably, some species showed intense and interstitially located hybridization signals, including *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. lanei*, *C. timbuiense*, *C. pterostictum* and *C. serrano* (Fig. 1). These ITSs were coincident with interstitial constitutive heterochromatic blocks and varied among different species and even between different populations of a single species (e.g. *C. pterostictum*) in number and position in the genomes of the analyzed specimens (Figs. 1, 2). Additionally, the species *C. lauroi*, *C. timbuiense*, *C. pterostictum* and *C. serrano* also presented two conspicuous and adjacent ITSs (Fig. 2).

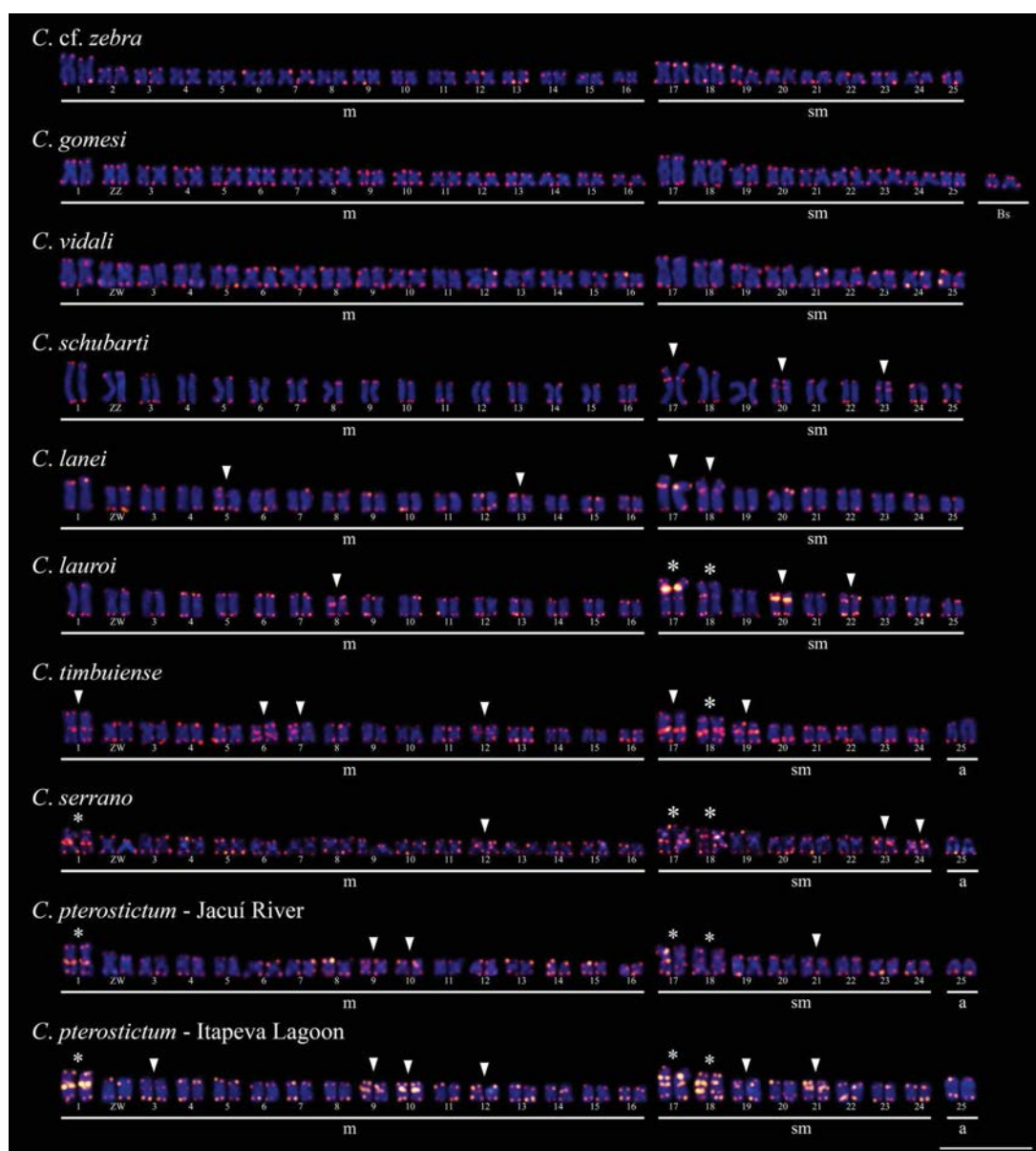


Fig. 1 Karyotypes of *Characidium* species after FISH with (TTAGGG)_n probes. *m* metacentric, *sm* submetacentric, *a* acrocentric, *Bs* B chromosomes. Arrowheads indicate ITS-bearing chromosomes. Asterisks indicate double-ITS-bearing chromosomes. Scale bar = 10 µm

Phylogenetic relationships among *Characidium* species

Given that the phylogenetic relationships among *Characidium* species would help to infer the evolutionary origin of ITSs and the acrocentric chromosomes of *C. timbuiense*, *C. serrano* and *C. pterostictum*, we built a molecular dendrogram using the mitochondrial CytB and COI genes of nine *Characidium* species and *A. elegans*.

We analyzed a final matrix with 1,518 characters; of these, 481 were variable, and 293 were parsimoniously informative. No stop codons, deletions or insertions were

observed in any of the sequences. The matrix nucleotide composition is 28.7 % thymine, 24.3 % cytosine, 29.1 % adenine and 17.9 % of guanine. Saturation was not observed because the Iss.c value was greater than the Iss value (Xia et al. 2003). Additionally, the graphic analysis of transitions and transversions versus genetic distance implemented in DAMBE also indicated that the data were not saturated ($R^2 = 0.91$ for transitions; $R^2 = 0.93$ for transversions). This matrix was used in the subsequent phylogenetic analysis. The best nucleotide substitution models selected for each partition after the model test

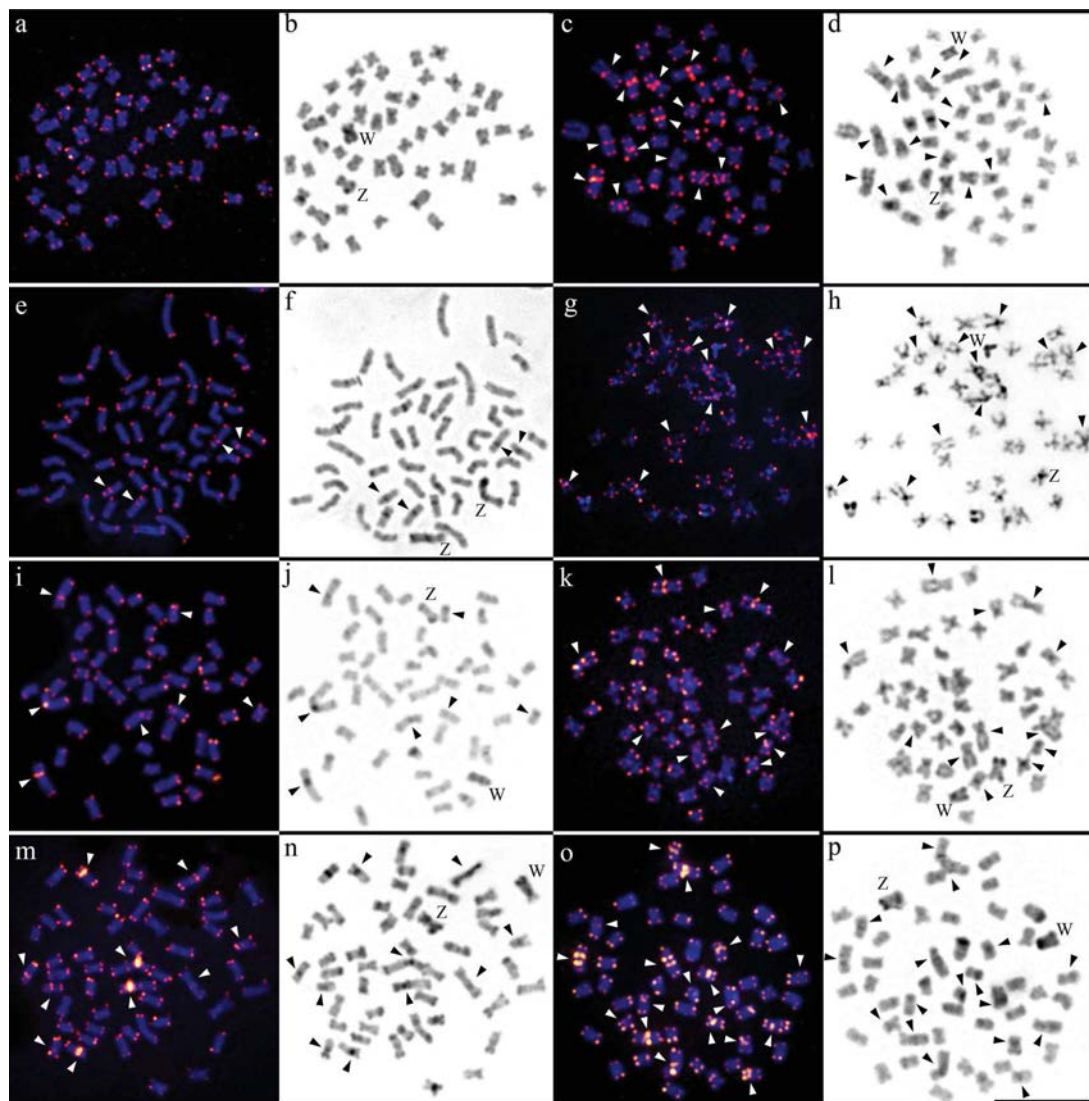


Fig. 2 Metaphase chromosome spreads after FISH with (TTAGGG)_n probes and sequential C-banding. **a, b** *C. vidali*, **c, d** *C. timbuiense*, **e, f** *C. schubarti*, **g, h** *C. serrano*, **i, j** *C. lanei*, **k, l** *C. pterostictum*—

Jacuí River, **m, n** *C. lauroi*, **o, p** *C. pterostictum*—Itapeva Lagoon. Arrowheads indicate chromosomes with interstitial telomeric sites. Z and W chromosomes are indicated. Scale bar = 10 μm

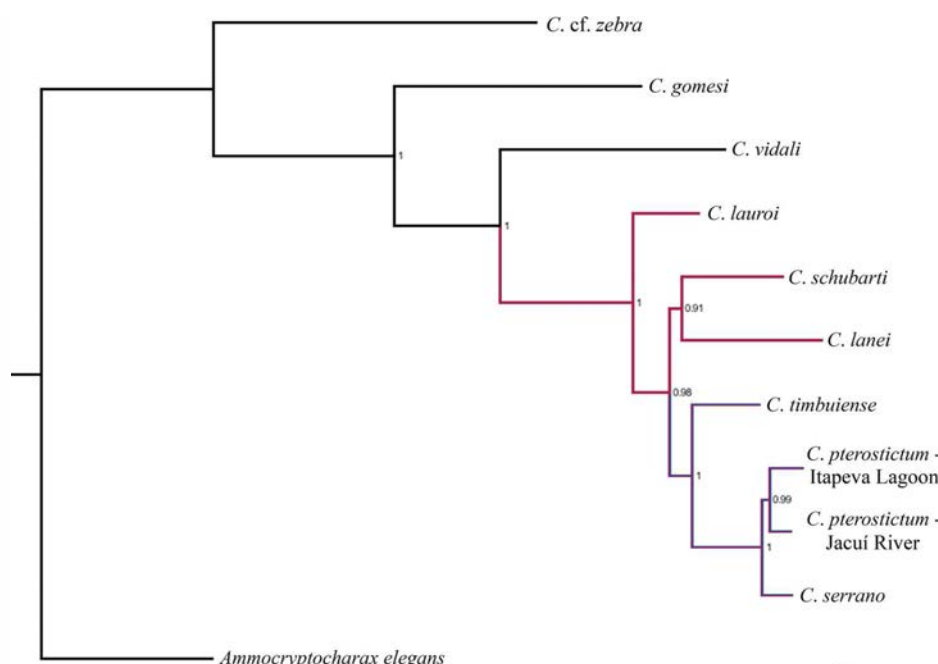
analysis are shown in Supplementary Table 1. The topologies yielded by Bayesian analyses showed high posterior probability in every node (>0.91).

The topology showed *C. cf. zebra* as the basal species in the *Characidium* phylogeny and *C. gomesi* and *C. vidali* appearing as the next branches in the cladogram. None of these three species showed ITSs on their chromosomes. All the remaining species showed ITS-bearing chromosomes and constitute a monophyletic group. Notably, *C. timbuiense*, *C. serrano* and two populations of *C. pterostictum*, all of them showing a pair of acrocentric chromosomes, also constitute a monophyletic group (Fig. 3).

Discussion

The karyotypes of *C. vidali*, *C. timbuiense* and *C. serrano* were described herein for the first time and these three species showed the ZZ/ZW sex chromosome system. In addition, our molecular data considering nine species of *Characidium* showed *C. cf. zebra* as the basal group of the phylogenetic tree. Remarkably, this is the only species in our study that does not show heteromorphic sex chromosomes. These results corroborate the single origin hypothesis of the ZZ/ZW sex chromosomes in this genus (Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2014; Pucci et al. 2014).

Fig. 3 Consensus topology obtained by Bayesian analysis of the concatenated mtDNA dataset. The numbers over each node represent the posterior probability for that split obtained in the Bayesian analysis. Clades labeled in *red* correspond to species with ITS-bearing chromosomes; clades labeled in *red/blue* correspond to species with ITS-bearing chromosomes + a pair of acrocentric chromosomes. (Color figure online)



Irrespective of the sex chromosomes, the karyotypes of *Characidium* species are remarkably homogeneous, including their size and shape. Such karyotype homogeneity indicates that macro-chromosomal changes, such as chromosomal fusions or fissions, did not occurred in the evolutionary history of this group, although some techniques are necessary to confirm this assertion (e.g. G-banding, Cross-species FISH). Therefore, the detection of ITSs on the chromosomes of several related species and the absence of such sites in other congeneric species is a remarkable feature.

Molecular data presented here indicates that the species that do not show any ITS, i.e., *C. cf. zebra*, *C. gomesi* and *C. vidali*, do not constitute a monophyletic group. However, all the other species that show ITSs do form a monophyletic group, suggesting that ITS spread is a derived condition in this genus. Several studies have already demonstrated some examples of ITSs that were not relicts of any rearrangement (Pagnozzi et al. 2000, 2002; Nanda et al. 2008). Indeed, it was also shown that telomeric DNA might be associated with satellite DNAs, which could explain their interstitial distribution (Adegoke et al. 1993; Garrido-Ramos et al. 1998; Pagnozzi et al. 2000; Metcalfe et al. 2004). Additional possibilities include the insertion of (TTAGGG)_n repeats by telomerase or even the transposition of these sites with DNA double-strand break repair, followed by amplification (Nergadze et al. 2007; Lin and Yan 2008; Ruiz-Herrera et al. 2008). Here, considering some ITS features such as (1) differential spreading at the between-species and interpopulational

levels, (2) the main centromeric-location and (3) the general coincidence with heterochromatic regions, we suggest that (TTAGGG)_n repeats may be associated with a satellite DNA in *Characidium*. Such association emerged once in evolutionary history of *Characidium* and most likely occurred before the split of several species, including *C. pterostictum*, *C. serrano*, *C. schubarti*, *C. timbuiense*, *C. lanei* and *C. lauroi*. Afterwards, each ITS cluster appears to have followed its own and particular evolutionary pathway in each species/population. Taking into account the high degree of diversification and spreading of those sites, we propose that transposition and/or ectopic recombination may be playing an important role in the dispersion of ITS clusters on the chromosomes of *Characidium*. These mechanisms have already been attributed to act in the spreading of repetitive sequences, like ribosomal genes and satellite DNAs (Vicari et al. 2008b; Nguyen et al. 2010; Silva et al. 2013; Bueno et al. 2013).

Remarkably, *C. timbuiense* and *C. serrano* presented one acrocentric pair, a character that was initially assumed to be restricted to *C. pterostictum* and *Characidium* sp. (Pansonato-Alves et al. 2010; Pucci et al. 2014). Pansonato-Alves et al. (2010) suggested that this acrocentric pair originated through a pericentric inversion in a submetacentric pair. Our results add new data on this topic and suggest that such a rearrangement most likely occurred before the cladogenesis of *C. timbuiense*, *C. pterostictum* and *C. serrano*. Later, a notable and differential heterochromatin accumulation was established in these chromosomes in different *C. pterostictum* and *C. serrano*

populations (Pansonato-Alves et al. 2010; Pucci et al. 2014; present paper). Although these acrocentric chromosomes are suggested to have experienced a pericentric inversion, ITSs could not be identified on these specific chromosomes.

The occurrence of a putative relationship between *C. pterostictum* and *C. timbuiense* was suggested by Buckup and Reis (1997). However, these authors were unable to relate *C. serrano* to the other congener species. Here, we provide molecular and cytogenetic evidence for the close relationship among the three species. These species are distributed along the drainages of the Brazilian shield, such as the Uruguay river basin (*C. serrano*) and Brazilian east basin complex (*C. pterostictum* and *C. timbuiense*) (Buckup and Reis 1997); previous studies have already shown the close relationship between these basins (Reis et al. 1990; Silva 2004; Lucinda 2005). Indeed, Ribeiro (2006) suggested that the close relationship between species distributed along distinct drainages of this area can be explained by drainage interchanges caused by the tectonic reactivations of crustal faults present in this area.

Using a multiple approach integrating cytogenetic and molecular tools, we were able to track specific chromosome changes restricted to a particular *Characidium* species group (e.g. the origin of an acrocentric pair and ITSs emergence and spread). Due to the variable chromosomal locations found in this study, the referenced ITSs are likely to be associated with a satellite DNA, which is probably being dispersed through the karyotype by means of transposition-mediated events and ectopic recombination. Therefore, each ITS/satellite DNA cluster appears to follow its own and particular evolutionary pathway in each species/population. In conclusion, our results indicate the occurrence of intense and continuous genomic changes in closely related species of *Characidium*.

Acknowledgments This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) from Brazil.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adegoke JA, Árnason U, Widegren B (1993) Sequence organization and evolution, in all extant whalebone whales, of a DNA satellite with terminal chromosome localization. *Chromosoma* 102:382–388
- Blackburn EH, Greider CW (1995) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Bourgain FM, Katinka MD (1991) Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the *Paramecium primaurelia* macronucleus. *Nucleic Acids Res* 19:1541–1547
- Buckup PA (2003) Family Crenuchidae (South American Dar- ters). In: Reis RE, Kullander ESO, Ferraris CJ Jr (eds) Check list of the freshwater fishes of south and central America, 2nd edn. Edipucrs, Porto Alegre, pp 87–95
- Buckup PA, Reis RE (1997) Characidiin genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in Southern Brazil, with description of three new species. *Copeia* 3:531–548
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS ONE* 8:e66532
- Drummond AJ, Kearse M, Heled J, Moir, Thierer T, Ashton B, Wilson A and Stones S Havas (2006) Geneious v5.4.2
- Edgar RC (2004) Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform* 5:113
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31:137–144
- Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M (1998) A satellite DNA of Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet* 83:3–9
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) Mrbayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780
- Kocher TD, Thomas MK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6196–6200
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220
- Lin WK, Yan J (2008) Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res* 658:95–110
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content in eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Repetitive DNA genome dynamics v 7*. Karger, Basel, pp 1–28
- Lucinda PHF (2005) Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotrop Ichthyol* 3:259–270
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artioni RF, Vicari MR (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genet* 12:1–8
- Metcalfe CJ, Eldridge MDB, Johnston PG (2004) 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 Res* 12:405–414
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservative of the human telomere sequences (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7049–7053
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PCM, Foresti F, Nagamachi CY (2013) Are NOR always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS ONE* 8:e55608
- Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M (2008) Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenet Genome Res* 122:396–400

- Nergadze SG, Santagostino MA, Salzano A, Mondello C, Giulotto E (2007) Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol* 8:R260
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343–354
- Ocalewicz K (2013) Telomeres in fishes. *Cytogenet Genome Res* 141:114–125
- Ocalewicz K, Furgala-Selezniow G, Szmyt M, Lisboa R, Kucinski M, Lejk AM, Jankun M (2013) Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. *Genetica* 141:409–416
- Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (2000) Intraspecific variation in the distribution of interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res* 8:585–591
- Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y (2002) 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* 98:278–284
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotrop Ichthyol* 8:77–86
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F (2011a) Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *J Fish Biol* 78:183–194
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2011b) Karyotypic conservatism in samples of *Characidium cf. zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genet Mol Biol* 34:208–213
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Costa-Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2014) Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS ONE* 9:e107169
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- 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* 111:541–553
- Rambaut A, Drummond AJ (2007a) Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 4 Jan, 2012
- Rambaut A, Drummond AJ (2007b) Tree Annotator v1.4.8. <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>. Accessed 4 Jan, 2012
- Reis RE, Weber C, Malabarba LR (1990) Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Rev Suisse de Zool* 97:729–766
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop Ichthyol* 4:225–246
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219–228
- Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO (2003) Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *Eur J Biochem* 270:389–403
- Silva JFP (2004) Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from southern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 2:55–60
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica* 141:329–336
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura KI (2002) Telomere lengths is characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 37:523–531
- Van Steensel B, Smorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401–413
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311–317
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008b) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeensis*. *Cytogenet Genome Res* 122:67–72
- Ward RD, Zemiak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B* 360:1847–1857
- Xia X, Lemey P (2009) Assessing substitution saturation with DAMBE. In: Lemey P, Salemi M, Vandamme AM (eds) *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 615–630
- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92:371–373
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003) An index of substitution saturation and its application. *Mol Phylogenet Evol* 26:1–7