UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)

ESTUDO DA ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DO GÊNERO *Megaleporinus* A PARTIR DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS

CAROLINA CREPALDI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Abril - 2019

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)

Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus* a partir de sequências repetitivas

Carolina Crepaldi

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise-Maltempi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Abril - 2019

C917e

Crepaldi, Carolina
Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero Megaleporinus a partir de sequências repetitivas / Carolina Crepaldi. -- Rio Claro, 2019
100 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Patricia Pasquali Parise-Maltempi

1. Genômica. 2. Genética Animal. 3. Peixes de água doce. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Leporinus* a partir de sequências repetitivas

AUTORA: CAROLINA CREPALDI
ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO
Departamento de Biologia Celular / Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. MARCELO RICARDO VICARI
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética / Universidade Estadual de Ponta Grossa

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus* a partir de sequências repetitivas"

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que contribuíram de alguma maneira durante este período de meu mestrado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, por oferecer a sede e a estrutura para a realização deste trabalho, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular.

À Prof.ª Dr.ª Patricia Pasquali Parise-Maltempi por mais uma orientação, pelo carinho e pelo apoio depositados em mim em um trabalho tão querido por nós duas.

Aos integrantes do Departamento de Biologia, em especial aos grupos de Citogenética da Prof.ª Patrícia e do Prof. Diogo pelo convívio diário, pelos cafés e pelas amizades. Vocês são cientistas maravilhosos.

Aos meus irmãos de formação do CB 2011 que ainda caminham comigo, por todos os dias que passamos e que ainda vamos passar juntos.

Ao Caio Felipe Cavicchia Zamuner por ser muito mais do que um companheiro. Sempre juntos a anos e durante nossos mestrados não seria diferente. Eu sei que somos a força um do outro. Te amo, meu xuxu.

Aos meus pais, Regina e Luiz, por sempre apoiarem minhas decisões e pelo amor incondicional que transborda de vocês. Espero todos os dias que seja um orgulho ter uma filha cientista. Amo vocês!

Agradeço também ao auxílio financeiro provido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo número 2017/00195_7).

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

RESUMO

Cromossomos sexuais se apresentam como entidades dinâmicas dentro de um genoma, com evolução, morfologia e conteúdo genético únicos, e tendo evoluído de maneiras independentes dentro dos grupos de vertebrados. No caso dos peixes, apesar da maioria das espécies não apresentarem cromossomos sexuais diferenciados, existe uma enorme diversidade de mecanismos cromossômicos para a determinação do sexo, incluindo fêmeas ou machos heterogaméticos e sistemas simples ou múltiplos. Na maioria dos casos, a diferença entre os homólogos sexuais envolve blocos heterocromáticos, sendo bem estabelecidos em sistemas do tipo ZZ/ ZW em que perda ou ganho de heterocromatina são as principais causas de diferenciação entre estes cromossomos. O gênero *Megaleporinus*, pertencente à família Anostomidae e com cromossomo heteromórfico W, é um modelo interessante para estudo da evolução e seleção desta heterogametia, especialmente pela alta quantidade de sequências repetitivas presente em seus cromossomos sexuais e a possível implicação na diferenciação destes. Assim, no presente trabalho, a análise feita de elementos repetitivos pelo RepeatExplorer na fêmea de *Megaleporinus elongatus* mostrou que esta possuiu 22.2% dos *reads* aleatórios de seu genoma constituídos por DNAs repetitivos, sendo 5.6% correspondentes a DNAs satélites. Foram isolados 69 variantes de DNAs satélites da fêmea, com tamanhos entre 20pb e 245pb, que foram caracterizados e validados experimentalmente. Por fim, estes foram mapeados através de hibridação *in situ* fluorescente nos cromossomos da espécie. Os 16 variantes de DNAs satélites com sinais conspícuo de hibridação estavam entre os mais abundantes do genoma e com exceção de 3, estes satélites *clusterizados* estavam presentes no cromossomo heteromórfico W. Apesar de poucos estarem em relação ao total isolado estarem hibridados no cromossomo sexual, estes se mostram bem representativos e bem distribuídos no braço q do cromossomo sexual, denotando sua composição variada e acúmulo de repetições abundantes no seu pouco tempo de evolução. Estes mesmos DNAs satélites hibridados em *M. elongatus* foram mapeados em *Megaleporinus macrocephalus,* demonstrando a variável distribuição destes satélites quando comparando os cromossomos W das duas espécies, e em *Leporinus friderici,* onde a ausência de variantes *clusterizados* demonstra o acúmulo mais abundante e diferenciado nas espécies que possuem o cromossomo heteromórfico. Os dados obtidos fornecem mais informações sobre as características e a organização dos DNAs satélites do genoma da espécie de estudo, bem como auxilia a elucidar a distribuição e incidência deste tipo de sequências repetitivas no cromossomo sexual heteromórfico do gênero *Megaleporinus.*

Palavras-chave: Cromossomo sexual; conteúdo DNAs repetitivos; satelitoma; FISH; Characiformes

ABSTRACT

Sex chromosomes are dynamic entities inside a genome, presenting unique evolution, morphology and genetic content and having evolved independently within vertebrates. In fish, although most species do not present differentiated sex chromosomes, there is an enormous diversity of chromosomic mechanisms for sexual determination that may include female or male heterogamety and simple or multiple sexual systems. In most cases, the difference between sexual homologues involve heterochromatic blocks and this fact is well established in species with the ZZ/ZW system, in which the gain or loss of heterochromatin is the main cause for chromosome differentiation. The genus *Megaleporinus*, from the Anostomidae family and with a ZZ/ZW sexual system, is an interesting model for studies of evolution and selection of sex chromosomes in fish, especially because the presence of heteromorphic sex chromosomes is restricted to just a few species of the genus and there is a high quantity of repetitive sequences in their chromosomes. In the present work, the analysis of *Megaleporinus elongatus* female genome repetitive content by RepeatExplorer returned 22.2% of its analysed *reads* constituted of repetitive DNA. From this, 5.6% correspondes to satellite DNA, and 69 satDNA variants were isolated and manually annotated, with sizes ranging from 20bp to 245bp, and validated through PCR. These variants were mapped through fluorescent *in situ* hybridisation on the species' chromosomes. The 16 satellites that had conspicuous hybridisation signals were amongst the most abundant satellites in the female analysed genome *reads*, with exception of three of them. The signals on the W chromosome were distributed in a variable way throughout its q arm and although few variants were *clustered*, in comparison to the amount isolated through annotation, this chromosome's composition shows a relevant diversity and accumulation of repetitive content in the fast evolution process of its sex system. These same satDNA variants were physically mapped in *M. macrocephalus,* which showed a diverse distribution in this species' W chromosome in comparison to *M. elongatus;* and *Leporinus friderici*, where the absence of *clustered* satDNAs denotes the lack of abundant repetitions in this species and reiterates the high degree of satDNA accumulation on the *Megaleporinus* genus and its heteromorphic chromosome. The data obtained in this work offers more information about satDNA characteristics and organisation of the studied species, as well as helps clarify the distribution and incidence of these repetitive sequences in the heteromorphic sex chromosome throughout the genus as a whole.

Keywords : Sex chromosome; repetitive DNA content; satellitome; FISH; Characiformes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO……7
1.1 Considerações sobre Cromossomos Sexuais em Peixes……7
1.2 Citogenética do gênero de peixes *Megaleporinus*……9
1.3 DNAs satélites como marcadores citogenéticos……16
2. OBJETIVO……19
2.1 Objetivos específicos……19
3. MATERIAL E MÉTODOS……20
3.1 Materiais……20
3.2 Métodos ……21
3.2.1 Sequenciamento Illumina e caracterização de DNAs satélites……21
3.2.2 Construção de oligonucleotídeos e validação por PCR……25
3.2.3 Marcação de sondas e Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)……26
4. RESULTADOS……30
ARTIGO 1
Heteromorphic sex chromosome and its satDNA content in *Megaleporinus elongatus* (Anostomidae, Characiformes)……31

ARTIGO 2
Satellite DNA and sex chromosome evolution: insights regarding *Megaleporinus* (Anostomidae, Characiformes)……65

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS……91
6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS……93

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre Cromossomos Sexuais em Peixes

O conhecimento sobre a origem e a evolução de cromossomos sexuais tem sido alvo de pesquisas na Biologia desde sua descoberta, mas ainda há muito que se acrescentar ao conhecimento relacionado à estas unidades genéticas complexas. A evolução de sistemas de cromossomos sexuais acontece de maneira diversa e independente ao longo dos grupos de organismos (BULL, 1983; GRAVES; PEICHEL, 2010), e seu surgimento é atribuído a partir de um cromossomo autossômico. Este adquire genes determinantes de características sexuais e/ou genes supressores do sexo oposto e pode tornar-se diferente de seu homólogo e do restante do cariótipo, tanto em estrutura quanto em conteúdo genético (CHARLESWORTH et al. 2005; GRAVES, 2008).

Para os organismos que apresentam sistemas de cromossomos sexuais bem definidos, podem ser observados dois tipos de heterogametia cromossômica: a feminina, com o sistema ZW, na qual as fêmeas possuem exclusivamente o cromossomo W; e a masculina, com o sistema XY, em que o Y é exclusivo do macho (WHITE, 1977; DE ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2001; OGATA et al. 2008, GRAVES et al. 2008). No sistema simples de cromossomos sexuais existem dois cromossomos distintos, dos tipos XY ou ZW no sexo heterogamético, e dois idênticos, XX ou ZZ, no sexo homogamético. Podem ocorrer, no entanto, variantes múltiplas destes dois modelos de heterogametia como sistemas $Z_1W_1Z_2W_2$; X_1X_2Y; XY_1Y_2; XO, dentre outros (BERTOLLO et al. 1997; RENS et al. 2004; CENTOFANTE et al. 2006; CRUZ et al. 2011; VALENTIM et al. 2013; GAZONI et al. 2018). Para estes sistemas múltiplos, tem-se no cariótipo mais de um cromossomo X ou Z, e/ou mais de um Y ou W, como resultado de rearranjos estruturais (fusões, fissões ou translocações) partindo dos sistemas simples (DE ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2001; GRUETZNER et al. 2008; ELLEGREN, 2011).

Um evento considerado responsável pelo processo de diferenciação dos sistemas heterogaméticos é a supressão de recombinação entre os cromossomos

homólogos. Esta supressão evita a perda dos genes determinantes do sexo diferenciados ao longo da evolução, mantendo a modificação e garantindo a identidade do cromossomo sexual heteromórfico, tornando-o diferente de seu par (CHARLESWORTH et al. 2005; WRIGHT et al. 2016). A supressão de recombinação está diretamente relacionada com o acúmulo de heterocromatina do cromossomo diferenciado e ao consequente acúmulo de sequências repetitivas (ELLEGREN, 2011; SCHARTL et al. 2016; WRIGHT et al. 2016).

Esta relação entre eventos de supressão e a formação de cromossomos sexuais diferenciados já foi documentada em espécies dos mais diversos grupos de organismos, demonstrando a influência da presença dos elementos repetitivos nas modificações cariotípicas, e consequentemente genotípicas, de diversas espécies (CHARLESWORTH et al. 2005; CIOFFI; BERTOLLO, 2012; EZAZ et al. 2013; PALACIOS-GIMENEZ et al. 2013; EZAZ; DEAKIN, 2014; EZAZ et al. 2016).

O grande acúmulo de DNAs repetitivos é relacionado por muitos autores àqueles cromossomos sexuais que recentemente passaram a se diferenciar (EZAZ et al. 2006; MANK; AVISE, 2009). Muitas espécies do grupo dos peixes e dos anfíbios, por exemplo, possuem cromossomos sexuais em diferentes estágios de diferenciação, sendo considerados mais recentes em relação àqueles de mamíferos e aves (MANK et al. 2006). Os cromossomos destes grupos podem justamente beneficiar estudos evolutivos de cromossomos sexuais em geral, especialmente os diferenciados, além de auxiliar no entendimento das possíveis forças evolutivas por trás desta diferenciação (GRAVES et al. 2008, WRIGHT et al. 2016).

Em se tratando dos peixes, os mecanismos de determinação sexual genética são altamente lábeis. A aparição de novos cromossomos sexuais pode acontecer repetidas vezes dentro de uma família ou até mesmo de um mesmo gênero (MANK ; AVISE, 2009; ELLEGREN, 2011). Em muitas espécies estudadas até o momento, os cromossomos sexuais são considerados homomórficos, não sendo morfologicamente diferenciados entre si. Para aqueles que possuem cromossomos sexuais diferenciados, estes podem se apresentar como determinantes do sexo feminino (heterogametia feminina) ou masculino (heterogametia masculina) e

estarem organizados em sistemas simples ou múltiplos, implicando uma alta diversidade na evolução dos sistemas sexuais nesses organismos (DEVLIN NAGAHAMA, 2002; SCHARTL, 2004; HERPIN; SCHARTL, 2009; CHARLESWORTH; MANK, 2010). A diversidade da estrutura cromossômica dos cromossomos sexuais de peixes é atribuída ao acúmulo e ao dinamismo dos elementos repetitivos presentes em seus genomas (KONDO et al. 2004; PEICHEL et al. 2004; YANO et al. 2017).

Sendo o grupo de vertebrados mais diverso, com mais de 33000 espécies registradas até o momento (FROSE; PAULY, 2018), os peixes podem auxiliar no estudo da evolução de sistemas sexuais tanto para seu grupo, quanto para vertebrados em geral. Tomar conhecimento sobre os sistemas sexuais em peixes pode trazer base para o entendimento de determinação sexual como um todo (seja ambiental, seja genética) e para fornecer informações acerca do quão diversificados estes processos podem ser nos vertebrados, aquém dos cromossomos sexuais bem conservados de mamíferos e aves (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). O entendimento da biologia reprodutiva e dos diversos mecanismos que controlam as características sexuais também abrange o valor ecológico de manejo mais eficiente das espécies, e do valor econômico agregado à piscicultura e às técnicas de reprodução.

1.2 Citogenética do gênero de peixes *Megaleporinus*

Os peixes da família Anostomidae possuem uma estrutura cariotípica conservada entre seus 15 gêneros descritos, com número diploide 2n=54 cromossomos. A morfologia cromossômica também é bem similar entre suas espécies, com cromossomos essencialmente metacêntricos e submetacêntricos, sugerindo uma estrutura relativamente antiga para a mesma (GALETTI et al. 1991).

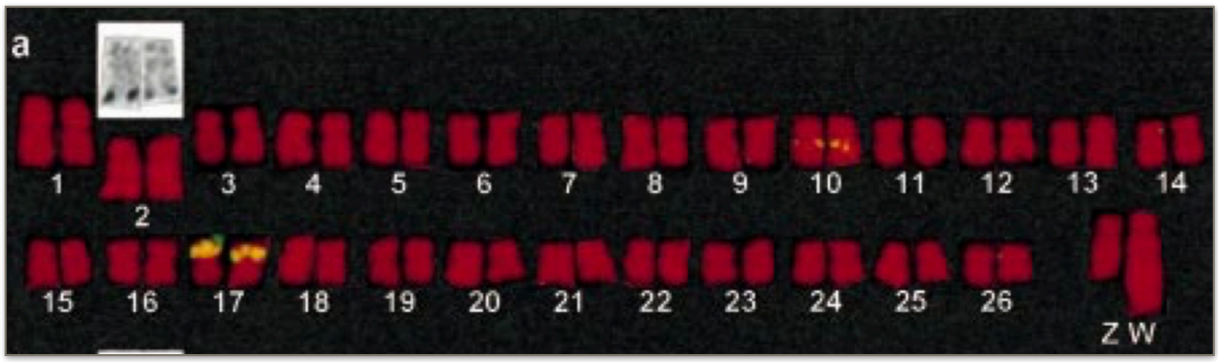
O gênero *Leporinus* possui o maior número de espécies da família, com aproximadamente 90 espécies descritas no total até o momento (GALETTI et al. 1991; BURNS et al. 2014; RAMIREZ et al. 2016). Conhecidos popularmente como Piau e Piapara, possuem ampla distribuição pela região neotropical e são peixes conhecidos pelo seu valor comercial para a pesca. O gênero *Leporinus* foi

recentemente desmembrado por Ramirez e colaboradores (2017) e algumas espécies, inclusive a do foco deste presente trabalho, foram reclassificadas no gênero *Megaleporinus.*

Em 2017, Ramirez e colaboradores reclassificaram algumas espécies do grupo, colocando aquelas que possuem sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW para um novo gênero, nomeado de *Megaleporinus.* Nove espécies anteriormente classificadas como *Leporinus (Leporinus elongatus, L. muyscorum, L. obtusidens, L. brinco, L. conirostris, L. trifasciatus, L. macrocephalus, L. piavussu e L. reinhardti*), juntamente da espécie *Hypomasticus garmani,* foram agrupadas no novo gênero *Megaleporinus.* Isso se deu graças à presença do cromossomo sexual heteromórfico nas fêmeas destas espécies e à características morfológicas discrepantes ao restante dos *Leporinus,* como, por exemplo, maior tamanho corpóreo e formulação da dentição diferenciada. O gênero *Leporinus* foi, então, dividido pelos autores em duas linhagens distintas, uma essencialmente contendo as espécies que possuem o cromossomo W e a outra, que permaneceu como *Leporinus*, com espécies que não possuem sistema de cromossomos sexuais diferenciados (RAMIREZ et al. 2017).

O gênero *Megaleporinus* têm sido foco de diversos estudos citogenéticos por conta da presença de um sistema de cromossomos sexuais com heterogamia feminina (ZZ/ZW) em suas sete espécies (GALETTI, LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al. 2004; RAMIREZ et al. 2017). O cromossomo heteromórfico W, de tamanho grande e subtelocêntrico, se mostra altamente heterocromático; diferente do cromossomo Z, que mantém seu tamanho semelhante aos cromossomos autossômicos e apresenta somente a terça parte distal de seu braço longo heterocromática (NAKAYAMA et al. 1994; GALETTI et al., 1995; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; HASHIMOTO et al. 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Cariótipo 2n=54 cromossomos de fêmea de *Megaleporinus elongatus*. Em destaque estão o par 2 na caixa branca, com impregnação por prata para evidência da região organizadora do Nucléolo (NOR); pares 10 e 17 com sinais de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para 5S rDNA; e par sexual com o W heteromórfico ao canto inferior direito. Fonte: Adaptado de Martins e Galetti (1999).



Os cromossomos sexuais W das espécies de *Megaleporinus* apresentam alto grau de similaridade em relação ao seu tamanho, a posição do centrômero e a quantidade de heterocromatina, o que indica uma provável evolução desse sistema a partir de um mesmo par cromossômico ancestral (GALETTI et al. 1995; POLTRONIERI et al. 2014). É aceita a hipótese do acúmulo de elementos repetitivos no cromossomo W como um dos maiores responsáveis pela diferenciação dos cromossomos sexuais no gênero, e muito provavelmente na família Anostomidae como um todo (NAKAYAMA et al. 1994; PARISE-MALTEMPI et al. 2007). Dados obtidos por meio de técnicas de citogenética molecular da composição dos cromossomos W das espécies deste gênero, no entanto, mostram que eles diferem quanto ao conteúdo e distribuição das sequências repetitivas. Isto denota um grau de complexidade no que concerne a formação deste cromossomo sexual ao longo das espécies próximas, apesar da possível origem comum atribuída a eles (NAKAYAMA et al. 1994; MOLINA; GALETTI, 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; DA SILVA et al. 2012; POLTRONIERI et al. 2014).

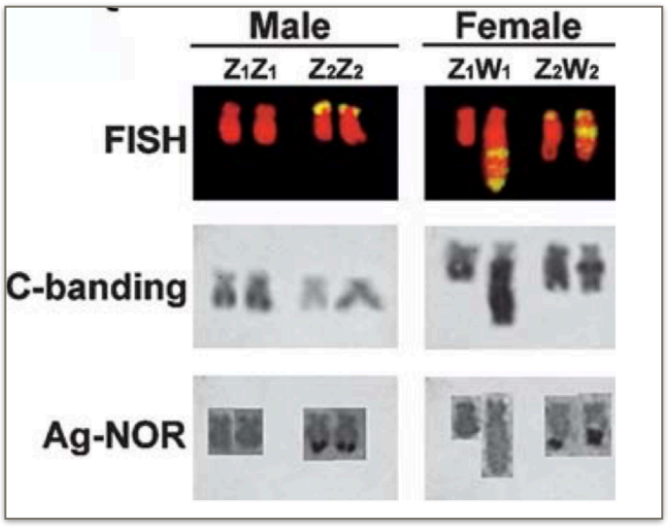
Diversos estudos já focaram no isolamento e caracterização de elementos repetitivos presentes no cromossomo W de espécies do gênero, bem como as possíveis correlações entre a presença de heterocromatina constitutiva abundante e a diferenciação deste cromossomo. Estes estudos iniciaram a análise do potencial de se atrelar análises moleculares destes elementos repetitivos no cariótipo de

espécies de Anostomidae e a evolução de seus cromossomos sexuais (NAKAYAMA et al. 1994; KOEHLER et al. 1997; FERREIRA et al. 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; HASHIMOTO et al. 2009; DA SILVA et al. 2012; POLTRONIERI et al. 2014).

Nakayama e colaboradores (1994), por exemplo, isolaram dois DNAs repetitivos da espécie *M. elongatus* (então nomeada *L. elongatus),* tendo um deles hibridado especificamente no cromossomo W das fêmeas da espécie. No entanto, três indivíduos ZW não tiveram seus cromossomos W marcados pela sonda, sugerindo que estes cromossomos sexuais atípicos teriam perdido essas regiões através de eventos de recombinação entre os cromossomos Z e W. Koehler e colaboradores (1997) isolaram um satélite de 483pb de indivíduos de *M. obtusidens* (então nomeada *L. obtusidens*) que foi hibridado em metáfases mitóticas de indivíduos da mesma espécie, bem como em indivíduos de *M. elongatus,* revelando a presença deste satélite na região pericentromérica de um único par de cromossomos em ambas as espécies, tornando-o um útil marcador para o gênero.

Com o uso de técnicas de digestão com enzimas de restrição, Parise-Maltempi e colaboradores (2007) isolaram do genoma de *M. elongatus* um elemento repetitivo de aproximadamente 650pb, denominado Le*Spe*I. Utilizando esta sequência como sonda em experimentos de hibridação *in situ,* os autores observaram marcações muito semelhantes no cromossomo W da espécie e em um dos homólogos de um par autossômico. Nas metáfases de machos, os sinais apareciam na região subtelomérica de um par de homólogos (Figura 2).

Figura 2 - Cromossomos sexuais múltiplos de macho e fêmea de *M. elongatus.* Hibridação *in situ* fluorescente da sequência repetitiva Le*Spe*I e seus padrões de hibridação no cromossomo sexual heteromórfico (W_1) e no par 2 com a NOR na fêmea; e com marcações subteloméricas no par da NOR no macho. A técnica de bandamento C evidencia o cromossomo W_1 com o braço longo altamente heterocromático, e as regiões de acúmulo de heterocromatina no par designado Z_2W_2. Impregnação por prata demonstra a NOR nos pares múltiplos. Fonte: adaptado de Parise-Maltempi et al. (2007).



Os resultados obtidos fizeram com que os autores levantassem a suspeita da existência de um sistema múltiplo de cromossomos sexuais, do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2$/ $Z_1W_1Z_2W_2$, sugerindo que esses cromossomos ainda estão em processo de diferenciação nesta espécie.

Marreta e colaboradores (2012) demonstraram um padrão sexo-específico de distribuição de Le*Spe*I, demarcando sua relação com a diferenciação do cromossomo W de *M. elongatus,* bem como das espécies próximas *M. macrocephalus e M. obtusidens* (que também possuem o sistema ZZ/ZW). Os padrões de marcação de Le*Spe*I entre os cromossomos W analisados, apesar de similares, não se mostraram idênticos entre estas espécies de *Megaleporinus*, indicando que processos evolutivos diferentes podem ter ocorrido entre a sequência repetitiva das mesmas. Além disso, a fêmea de *Megaleporinus elongatus* foi a única que apresentou sinais em segundo par cromossômico (correspondendo a Z_2W_2), reafirmando a proposição de Parise e colaboradores (2007). A ausência da sequência na espécie *Leporinus friderici*, que não possui cromossomos sexuais, foi interpretada pelos autores como Le*Spe*I sendo uma sequência repetitiva associada

a diferenciação dos cromossomos sexuais do gênero. Estas mesmas sequências foram úteis na discriminação de híbridos específicos de *M. macrocephalus* e *M. elongatus* em sistemas de piscicultura (HASHIMOTO et al. 2009).

Um outro fragmento repetitivo, nomeado de Le*Spe*I, foi isolado de *Megaleporinus elongatus* e hibridado em metáfases de indivíduos da espécie, bem como de espécies próximas que possuem cromossomos sexuais (*M. macrocephalus, M. obtusidens)* e espécies que não os possuem *(L. striatus, L. friderici, Schizodon borellii, S. isognathus).* Os resultados mostraram marcações positivas em todos os cromossomos para as espécies que possuem cromossomos sexuais diferenciados (*M. elongatus, M. macrocephalus, M. obtusidens)*, exceto nos cromossomos sexuais de *M. elongatus*, ficando estes sinais restritos aos cromossomos autossômicos. Os autores sugerem que a ausência de Le*Spe*I nos cromossomos sexuais (W1, Z2 e W2) da fêmea de *M. elongatus* pode estar relacionada com o acúmulo e fixação de outras sequências repetitivas. Isto geraria a subsequente diferenciação do sistema sexual para um sistema múltiplo, tendo promovido rearranjos cromossômicos e modificações cariotípicas diferenciadas em relação às outras espécies do gênero (DA SILVA et al. 2012).

O mapeamento de um fragmento repetitivo de 378pb denominado *Sma*I, isolado com enzima de restrição, revelou sinais específicos para indivíduos de *M. elongatus;* diferente de Le*Spe*I (PARISE-MALTEMPI et al. 2007), presente também em espécies próximas do gênero. Este fragmento foi, então, mapeado pelos autores via hibridação *in situ* fluorescente e localizado junto à região organizadora do nucléolo (NOR) em ambos os sexos. Puderam observar diferenças quanto à distribuição de heterocromatina entre *M. elongatus* e outros *Megaleporinus*, novamente apontado para a variabilidade de sequências repetitivas presentes nos cromossomos das mesmas (DA SILVA et al. 2013).

Uma sonda derivada da microdissecção do cromossomo heteromórfico W de *M. elongatus* foi isolada por Parise-Maltempi e colaboradores (2013). Esta foi utilizada para análise da possível hibridação da mesma nos cromossomos de outras espécies do gênero. A sonda foi hibridada em cromossomos W das espécies *M.*

macrocephalus e M. obtusidens, e não mostrou sinais de marcação em outras quatro espécies de Anostomidae analisadas que não possuem cromossomos sexuais definidos. É interessante destacar que os autores também encontraram sinais de hibridação nos cromossomos Z destas outras duas espécies, mas não no cromossomo Z de nenhum dos sexos do próprio *M. elongatus.* Esta provável falta de compartilhamento de sequências repetitivas entre os cromossomos Z e W de *M. elongatus* reafirma a probabilidade de estarem em um diferente estágio de diferenciação em comparação com as espécies próximas.

O mapeamento de microssatélites específicos ((A)30, (C)30, (CA)15, (GC)15, (GA)15, (GAA)10, (CAG)10, e (CAT)10) para localização cromossômica dos mesmos em quatro espécies de *Megaleporinus (M. elongatus, M. obtusidens, M. conirostris e M. reinhardti)* e análises comparativas de seu acúmulo nos cromossomos sexuais foi realizado por Poltronieri e colaboradores (2014), reiterando o grande acúmulo de DNAs satélites no cromossomo W das mesmas. Novamente, a relação entre heterocromatinização e presença de sequências repetitivas em tandem e a evolução do sistema sexual no gênero foi validada, demonstrando a variedade de distribuições destas sequências entre as espécies analisadas, com marcações discrepantes entre os cromossomos W.

Em outro estudo envolvendo espécies do gênero, De Barros e colaboradores (2018) realizaram a microdissecção de um cromossomo W de *Megaleporinus trifasciatus.* A sonda obtida, denominada WMt, foi também utilizada em experimentos comparativos com as espécies *M. macrocephalus* e *M. elongatus.* Os autores observaram grande similaridade entre as marcações nos cromossomos W das três espécies estudadas. A pequena diferença observada entre eles foi atribuída como sendo devido a um acúmulo de elementos repetitivos (especialmente elementos transponíveis) conservados ao longo do gênero, o que provavelmente contribuiu para o aparecimento do sistema sexual ZZ/ZW e para os diferentes graus de diferenciação entre eles.

Apesar de todos estes estudos envolvendo a distribuição cromossômica de sequências repetitivas relacionadas ou não aos cromossomos sexuais,

especialmente em *Megalepoinus*, dados relacionados a esse tema em peixes ainda estão limitados a resultados obtidos por métodos citológicos de coloração convencional e isolamento de poucas sequências do cromossomo sexual. Dados moleculares sobre essas sequências repetitivas também estão restritos a poucas espécies em comparação à vasta diversidade do grupo de peixes (MARTINS, 2007; VICARI et al. 2010). Se estas sequências repetitivas, responsáveis pelo aumento de heterocromatina constitutiva, estão atreladas à evolução dos cromossomos sexuais em peixes ou se são meramente uma consequência desta evolução, permanece sem resposta. Isto abre caminhos para pesquisas mais aprofundadas destas características cromossômicas para novas elucidações quanto à peculiar evolução da determinação sexual no gênero e no grupo dos peixes em geral.

1.3 DNAs satélites como marcadores citogenéticos

DNAs repetitivos são sequências individuais de DNA que se repetem diversas vezes e constituem grandes frações do genoma eucarioto. São caracterizados fundamentalmente pela sua organização em tandem, caracterizando os chamados DNAs satélites, ou por elementos dispersos, como transposons e retrotransposons (FLAVELL et al. 1974; JURKA et al., 2005; PLOHL et al. 2008). São estruturas altamente dinâmicas, frequentemente submetidas à diversos processos de amplificação gênica e mutações em bases nitrogenadas, com uma alta diversidade no que concerne sua ocorrência e composição (PLOHL et al. 2012).

DNAs repetitivos costumam se localizar preferencialmente em regiões heterocromáticas dos cromossomos, como teloméricas e centroméricas, formando a estrutura da heterocromatina (PLOHL et al. 2012; RUIZ-RUANO et al. 2016). São altamente variáveis em sua ocorrência, podendo estar presentes ao longo de todo o cariótipo ou ocorrerem apenas em cromossomos específicos, como os sexuais e/ou cromossomos supranumerários.

Apesar das sequências repetitivas não serem regiões essencialmente codificantes em sua maioria, tendo sido por muito tempo consideradas sequências de “DNA lixo” (NOWAK, 1994), vem-se gradativamente demonstrando seus papéis

ativos nos genomas dos mais diversos organismos (SHAPIRO et al. 2005; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; PLOHL et al. 2012). Algumas funcionalidades incluem manutenção e propagação do material genético nuclear (MARTINS, 2007); participação na regulação estrutural da cromatina (VOLPE et al. 2002) e na formação e manutenção da região centromérica (PLOHL et al. 2014; JAGANNATHAN; YAMASHITA, 2017).

DNAs repetitivos em geral podem estar presentes em grupos de sequências semelhantes, apontando para origens com ancestrais comum entre estas (PLOHL et al. 2012, LORITE et al. 2017); no entanto, podem evoluir de maneira independente dentro de cada grupo de organismo, demonstrando que estes elementos possuem tanto características conservadas quanto altamente variáveis (PLOHL et al. 2012; QUESADA DEL BOSQUE et al. 2013; MEHROTRA et al. 2014; GARRIDOS-RAMOS, 2015; LORITE et al. 2017). DNAs satélites (satDNA), por exemplo, podem se diversificam em questão de abundância no genoma, localização e organização cromossômica, tamanho do monômero em pares de base e a sequência nucleotídica em si (PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL et al. 2012).

É sabido que peixes são animais que podem evoluir de forma extremamente rápida, possuindo ferramentas evolutivas em seus genomas que merecem ser exploradas (OZOUF-COSTAZ et al. 2004). Diversos trabalhos nesta perspectiva mostram resultados relevantes utilizando sequências repetitivas como marcadores citogenéticos para o grupo (MESTRINER et al. 2000; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; SAITO et al. 2007; FERREIRA; MARTINS, 2008; POLETTO et al. 2010; VALENTE et al. 2010; VICARI et al., 2010; CIOFFI; BERTOLLO, 2012; YANO et al. 2016, YANO et al. 2017).

Trabalhos utilizando o sequenciamento do genoma e subsequente análises refinadas para caracterização de sequências repetitivas vêm revelando novas informações sobre estes componentes genômicos (SHENDURE; JI, 2008; SCHUSTER, 2008; RUIZ-RUANO et al. 2016; RUIZ-RUANO et al. 2018). Para o grupo do peixes neotropicais, análises recentes para a espécie *Austrolebias* (GARCIA et al. 2015), *Astyanax* (SILVA et al. 2017) e outras espécies de Characidae

(UTSUNOMIA et al. 2017) abriram portas para caracterizações mais abrangentes acerca dos DNAs repetitivos dos peixes, mas estas ainda permanecem escassas em comparação à diversidade do grupo.

Por estes motivos, o presente trabalho teve como principal foco a análise do conteúdo de DNAs satélites no genoma de *Megaleporinus elongatus* e subsequente mapeamento destas sequências em cromossomos da espécie, buscando informações sobre a caracterização de seus DNAs satélites e sua distribuição no cromossomo sexual heteromórfico W, evidenciando características sexo-específicas do acúmulo de DNAs repetitivos em seu genoma. Em seguida, o mapeamento cromossômico dos mesmos DNAs satélites isolados foi realizado em outras duas espécies, *M. macrocephalus* (que também possui cromossomo heteromórfico W) e *Leporinus friderici*, sem cromossomos sexuais aparentes, permitiu avaliar a ocorrência e distribuição destes repetitivos entre espécies próximas, e as possíveis implicações disto em relação à diferenciação do cromossomo W a nível de gênero.

2. OBJETIVO

Entender a diferenciação dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus* em sua etapa de acúmulo de sequências de DNAs satélites e a formação da região restrita ao cromossomo heteromórfico W.

2.1 Objetivos Específicos

- Isolar, caracterizar e estudar a organização de DNAs satélites presentes no genoma de *Megaleporinus elongatus* (Anostomidae), bem como fazer a localização cromossômica destas sequências com foco no cromossomo heteromórfico W.

- Verificar a presença ou ausência destas sequências de DNAs satélites obtidas e avaliar sua distribuição nos cromossomos de fêmeas de *Megaleporinus macrocephalus*, espécie próxima que também possui sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, e *Leporinus friderici,* espécie sem cromossomos sexuais heteromórficos. Com isso, buscar informações para explicar os diferentes padrões de distribuição de DNAs repetitivos nestas espécies, buscando o entendimento sobre a evolução da diferenciação dos cromossomos sexuais neste grupo de peixes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados tecidos de fígado e preparações de suspensão celular de três indivíduos de cada sexo de *Megaleporinus elongatus* (Figura 3). Estes materiais foram previamente obtidos no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMBio) em Pirassununga, São Paulo, Brasil, e encontravam-se armazenados em *freezer* no laboratório de citogenética animal da UNESP de Rio Claro.

Figura 3 - Fêmea de *Megaleporinus elongatus*. Fonte: acervo pessoal.



Foram também utilizadas preparações cromossômicas de *Megaleporinus macrocephalus e Leporinus friderici,* provenientes do Mato Grosso, que também estavam armazenadas no laboratório acima referido.

O presente trabalho está dentro das normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, tendo protocolo de número 3524 e código de aprovação comitê (09/2017). Para as preparações previamente obtidas de *Megaleporinus macrocephalus e Leporinus friderici,* os individuos, coletados na época de sua manipulação, estavam de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (19833-1) e com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (016/04 - CEEA).

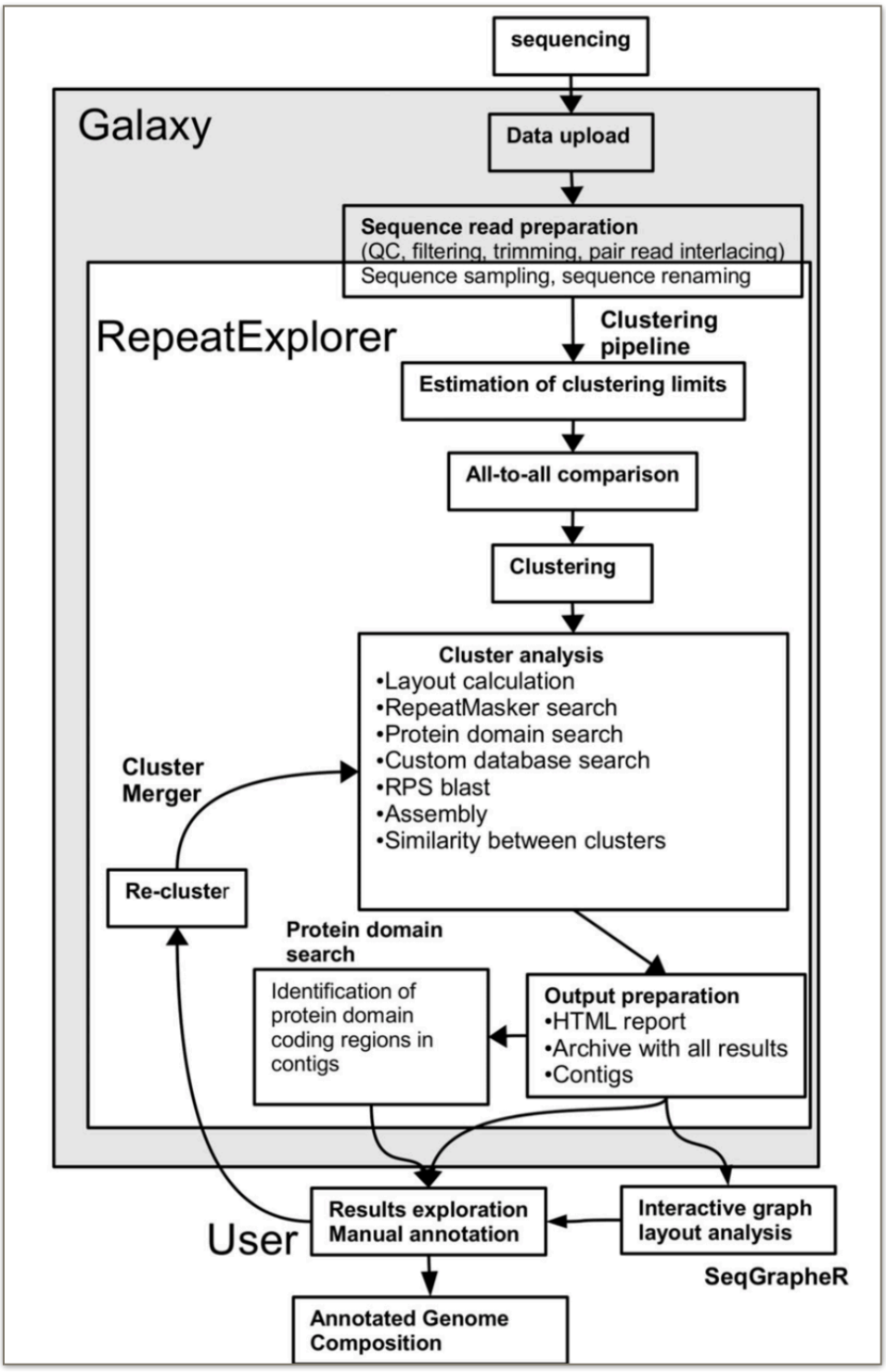
3.2 MÉTODOS

3.2.1 Sequenciamento Illumina e caracterização de DNAs satélites

Para o sequenciamento genômico através da plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), foram enviados para a empresa Macrogen (Korea) aproximadamente 5mg de fígado de fêmea de *Megaleporinus elongatus*. O DNA foi extraído pela empresa e foi sequenciado com baixa cobertura, com Illumina® Hiseq™ 2000 (2 x 101bp paired-end) utilizando TruSeq SBS Kit v3. Os *reads* obtidos do sequenciamento foram unidos utilizando o programa Fastq-join do FASTX-Toolkit com as opções básicas de entrada dos dados (GORDON; HANNON, 2010).

Para identificação e classificação das sequências de DNA repetitivo do genoma, 1000000 de *reads* aleatórios do total obtido do sequenciamento foram processados pelas ferramentas do RepeatExplorer (www.repeatexplorer.org) (NOVÁK et al. 2013), através de algoritmos de *clusterização* baseados em grafos (*graph-based clustering*) (Figura 4).

Figura 4 - *Pipeline* do RepeatExplorer, demonstrando seus princípios para identificação de repetições a partir de *reads* sequenciados de um genoma, para subsequente anotação manual das sequências repetitivas. Fonte: Novák et al. (2013).



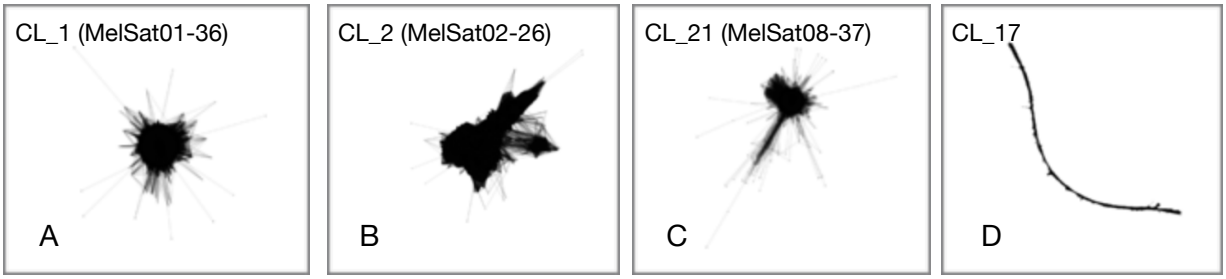
O sequenciamento genômico de baixa cobertura, como o utilizado para o genoma deste trabalho, e a análise do RepeatExplorer com os parâmetros padrões de limite de similaridade (90% de identidade para mais de 55% do tamanho da sequência repetitiva) tem baixas chances de detecção de sequências de cópias únicas. Isto demonstra que a grande maioria das similaridades esperadas e encontradas entre os *reads* aleatórios realmente correspondem à cópias de elementos repetitivos encontrados no genoma (NOVÁK et al. 2013).

Segundo os parâmetros do programa, os *reads* aleatórios do genoma da fêmea de *Megaleporinus elongatus* foram lidos e comparados entre si, e aqueles com similaridade foram selecionados pela ferramenta para serem agrupados (*clusterizados*). Os grafos do *layout* destes *clusters* foram, então, calculados pelo RepeatExplorer a partir das sobreposições que ocorreram entre os *reads* similares dentro de cada grupo (*cluster)*, servindo de ferramenta para a posterior anotação manual das sequências de DNAs satélites.

Os resultados do RepeatExplorer para o genoma consistiram em relatórios em formato HTML contendo revisões dos resultados da *clusterização,* bem como os arquivos individuais para cada *cluster* isolado com seus respectivos fragmentos de sequências (*contigs).* A proporção de representatividade de cada repetitivo no genoma foi apresentada em tabelas de caracterização dos mesmos, também geradas pelo *software*.

Cada *cluster* gerado pelo programa foi individualmente e manualmente analisado a partir de seus grafos, para uma primeira seleção daqueles que potencialmente correspondessem a sequências de DNAs satélites. A densidade destes *layouts* foi considerada para esta primeira triagem, isolando aqueles que possuem morfologia característica de sequência em tandem, sendo circulares, altamente densos e representando as diversas sobreposições entre os *reads* semelhantes (Figura 5A, 5B e 5C).

Figura 5 - Exemplos de *layouts* gerados para repetitivos CL_1, CL_2, CL_21 e CL_17 do genoma de fêmea de *Megaleporinus elongatus.* Os grafos A, B e C são característicos de *clusters* de repetitivos dispostos em tandem, onde os *reads* agrupados são representados por nós e suas similaridades são as arestas que conectam esses nós - caracterizado pelo gráfico como estando altamente sobrepostos e dando sua morfologia de alta densidade. O gráfico D corresponde à um repetitivo transponível, com o gráfico representando sequências de cópias não distribuídas em tandem e quase isento de sobreposição, colocado a título de comparação com o restante.



Após a primeira seleção, os arquivos dos *clusters* selecionados foram abertos na versão básica do *software* Geneious v4.8.5 (KEARSE et al. 2012) e foi feita a visualização de gráficos de Dotplot para cada um em busca da confirmação de sua organização em tandem.

Confirmada a organização em tandem a partir dos Dotplots, as sequências foram revisadas manualmente e individualmente, posteriormente alinhadas utilizando o sistema Muscle do programa MEGA v8.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015) para a geração da sequência consenso de cada variante de DNA satélite. Também no MEGA v8.0 foram analisadas suas porcentagens de conteúdo de A + T (adenina+timina). Os satélites foram analisados pela ferramenta BLAST *(Basic local alignment search tool)* para a procura de sequências já depositadas no banco de dados que possuíssem possíveis semelhanças com os DNAs satélites isolados.

As sequências consensos recuperadas e as informações de cada variante de DNA satélite isolado da fêmea foram tabeladas (Tabela 1), com a nomenclatura utilizada seguindo de acordo com o proposto por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016). Os códigos seguiram a abreviação de nome da espécie, um número em ordem crescente de acordo com a abundância do DNA satélite em questão e o

tamanho da unidade do repetitivo. Assim, a nomenclatura MelSat01-36 foi utilizada para o primeiro satélite da lista, o mais abundante, e com 36 pares de base, MelSat02-26 para o segundo mais abundante com 26 pares de base, e assim por diante.

3.2.2 Construção de oligonucleotídeos e validação por PCR

As sequências consenso dos variantes de DNAs satélites isolados do genoma de fêmea foram utilizadas para o desenho manual de oligonucletídeos (*primers)* divergentes e enviadas para a empresa Macrogen (Korea) para a sua síntese. Estes *primers* foram utilizados em uma amplificação por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para avaliação da confiabilidade dos mesmos, utilizando DNA genômico da própria fêmea de *Megaleporinus elongatus* na reação. Os produtos de amplificação bem sucedidos foram utilizados para a geração de sondas, para o posterior mapeamento cromossômico destes satélites por hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

Para as reações de PCR, o DNA genômico utilizado foi extraído de aproximadamente 5mg de fígado de indivíduos de *M. elongatus* com kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, com adição de RNAse (20mg/ml) (Roche®).

As reações de PCR, com volume final de 10 µl cada, contiveram 0.5 µl do DNA extraído (50-100ng/µl), 0.5 µl de dNTPs (5mM) (Invitrogen®), 0.1 µl de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (5U/µl) (Invitrogen®), 0.25 µl de $MgCl_2$ (50mM) (Invitrogen®), 1.0 µl de tampão 10x PCR (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen®), 0.5 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse)* a 10µM para cada satélite e foram completadas com 8.65 µl de H_2O milliQ autoclavada. A amplificação de todos os *primers* foi feita em um termociclador Eppendorf, nas condições de temperatura de 94°C durante os 5 minutos iniciais para desnaturação, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento de *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão por 1 minuto e 20 segundos a 72°C; e ao final, elongação por 5 minutos também a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese com géis de agarose 1%, corados com GelRed®, sendo as amostras eluídas em 1 µl de tampão de corrida *blue juice* (6x) e com 1 µl de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA *ladder (*ThermoFisher®). Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. Aqueles que tiveram amplificação satisfatória bem como sinal de marcação na hibridação *in situ* fluorescente em fêmeas de *M. elongatus,* foram enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen (Korea) para conferência da sua sequência consenso.

3.2.3 Marcação de sondas e Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Os produtos de PCR dos satélites com amplificação satisfatória foram marcados pela técnica de *nick translation* para a geração de sondas utilizadas para a hibridação *in situ* fluorescente*.* Estas sondas foram marcadas em reações individuais de 8.75 µl, contendo 3 µl de produto de amplificação de cada satélite, 0.75 µl de DNA polymerase I/DNase I (ThermoFisher®), 0.13 µl de digoxigenina-11-dUTP (Roche®), 0.1 µl de cada dNTP (dATP, dCTP e dGTP) (2.0 mM), 0.035 µl de dTTP (2.0 mM) , 0.5 µl de buffer para *nick translation* (NT buffer 10x) e completando com 2 µl de H_2O milliQ autoclavada. A marcação ocorreu em um termociclador Eppendorf por 90 minutos a 16°C e finalizando com 10 minutos a 65°C.

Para os experimentos de FISH, foram utilizadas lâminas contendo preparações cromossômicas de macho e de fêmea de *Megaleporinus elongatus,* em um primeiro momento, e preparações de fêmeas de *M. macrocephalus* e *L. friderici* para o Cross-FISH e comparação entre as espécies.

As preparações de suspensão celular utilizadas para as lâminas de hibridação *in situ* fluorescente foram realizadas a partir do rim retirado de exemplares das espécies, seguindo metodologia descrita por Foresti e colaboradores (1981). Para estimular a divisão celular, uma solução de fermento biológico (0,3g de fermento biológico comercial + 0,3g de açúcar + 10mL de água

destilada), foi injetada nos animais. Esses foram deixados em aquário aerado por 72 horas.

Após este período, foi injetada uma solução aquosa de colchicina (0,025%), na região intra-abdominal, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Após a injeção da solução, os exemplares foram mantidos em aquário bem aerado por 50 minutos. Foram retiradas as regiões posterior e anterior do rim, colocados em solução hipotônica de KCL (0,075M) para hipotonização das células. A solução foi transferida para um tubo de centrífuga e deixada por 21 minutos em uma estufa a 37ºC.

O material foi, então, pré-fixado com 7 gotas de fixador gelado (metanol 3: ácido acético 1) por cinco minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados mais 6 mL de fixador, com agitação da mistura, e o tubo foi levado à centrífuga por 10 minutos na velocidade de 900 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 7 mL do fixador, sendo novamente centrifugado por 100 minutos a 900 rpm. Este passo do procedimento foi repetido por duas vezes até a completa fixação e lavagem das células em suspensão. O material foi ressuspendido uma última vez em 1.5 mL de fixador e armazenado em microtubos de 1.5mL em freezer a -20ºC.

Para análise cromossômica do material, algumas gotas da preparação foram pingadas em lâminas de microscopia aquecidas a 60ºC, coradas após a secagem com solução de Giemsa 5% por 8 minutos. Após lavadas e secas ao ar livre, as lâminas estavam prontas para análise do material.

Os ensaios de FISH foram realizados de acordo com a técnica descrita por Pinkel e colaboradores (1986) com modificações de Cabral-de-Mello e colaboradores (2010), utilizando os materiais fixados de preparações de suspensão celular.

As preparações foram pingadas nas lâminas a 60°C e deixadas em estufa a 37°C por pelo menos 1 hora para a fixação do material. Cada lâmina passou por

uma desidratação em série alcóolica (70%, 90% e 100%) por 5 minutos cada e logo após incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida com 100 µl de RNAse (Roche®) (2.5µl de RNAse (20mg/ml) diluída em 998.5µl de solução salina 2xSSC (175.3g NaCl + 88.2g citrato de sódio + 800ml água destilada, ph=8.0, posteriormente diluído de 20x para 2x). Após a incubação, as lâminas passaram por três lavagens de 5 minutos cada em 2xSSC e depois foram novamente desidratadas em série alcóolica (70%, 90% e 100%) por 5 minutos em cada.

A desnaturação do DNA contido nas lâminas foi feita com formamida 70% (formamida 100% diluída em solução salina 20xSSC) a 70°C, com tempo de desnaturação de 1 minuto e 45 segundos. Imediatamente depois as lâminas foram submetidas a uma série alcóolica (70%, 90% e 100%) gelada (-20°C) por 5 minutos cada banho. Para a desnaturação da sonda, foram feitas soluções contendo 3µl de sonda marcada e 27µl de tampão de hibridação (*Hybuffer*) (25ml formamida + 10ml sulfato dextrano 50% + 5ml 20xSSC + 4ml fosfato de sódio 0,5M ph=8.0, 1ml 5x solução Denhardt) para cada lâmina, e que foram colocadas em termociclador Eppendorf por 10 minutos a 95°C. Cada lâmina recebeu os 30µl da solução contendo a sonda desnaturada, foi coberta com lâminula e mantida *overnight* em câmara úmida a 37°C.

Para a detecção da sonda, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas em solução salina 2xSSC por 10 minutos, em banho-maria a 72°C. Cada lâmina foi então incubada com 0.5 µl de anti-digoxigenina e 100 µl de solução PBD (3g de leite em pó, 60ml de solução salina 20xSSC, 1.50ml de Triton e completando com 300 ml de água destilada), a 37°C por 1 hora. Após a detecção, foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com a solução PBD a 45°C. Por fim, cada lâmina foi montada com 8 µl de solução de DAPI (4′,6-diamidino-2′-fenilindol) + Vectashield (Vector®), coberta com lamínula e armazenada no escuro a 4°C.

As lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência Olympus® BX51 com uma câmera digital (Olympus® DP71) acoplada. Para cada sonda, foram analisadas pelo menos vinte metáfases, para confirmação do número diplóide, estrutura cariotípica e do cromossomo heteromórfico (W), quando presente, e para

confirmação dos resultados da hibridação *in situ.* No mínimo cinco fotos foram tiradas daquelas com a melhor qualidade de visualização e a captura de imagens foi feita a partir dos *softwares* DP Controller v3.2.1 e DP Manager v3.1 (Olympus®). As fotos foram tratadas para melhoria de brilho e contraste e adição de legendas com *software* de edição de imagens.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho permitiram a elaboração de dois artigos, ambos finalizados e em fase de submissão para revistas especializadas.

Artigo 1- Heteromorphic sex chromosome and its satDNA content in *Megaleporinus elongatus* (Anostomidae, Characiformes)

Artigo 2- Satellite DNA and sex chromosome evolution: insights regarding *Megaleporinus* (Anostomidae, Characiformes)

ARTIGO 1

Heteromorphic sex chromosome and its satDNA content in *Megaleporinus elongatus* (Anostomidae, Characiformes)

Carolina Crepaldi[1], Patricia Pasquali Parise Maltempi[1]

[1]Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brazil.

Abstract

Teleost fish share a remarkable diversity of genetic sex determination systems, and the chromosome mapping of sex chromosomes' repetitive content can provide valuable insights regarding their specificities and differentiation processes. *Megaleporinus* species have a ZZ/ZW sexual system with highly heterochromatic W chromosomes, posing as interesting models for studies of sex systems evolution in fish, specially regarding the absence of heteromorphic sex chromosomes in the close-related genus *Leporinus.* Through high-throughput analysis of a *Megaleporinus elongatus* female genome, we isolated 69 satellite DNA variants, which represents approximately 5.6% of the analysed sequenced reads. The characterised satDNA have sizes ranging from 20bp to 245bp and variable nucleotide composition. All of these variants were tested regarding physical mapping in *M. elongatus* metaphases. 16 showed clustered patterns in the female chromosomes, with conspicuous FISH signals in the sex chromosome and some autosomal pairs. From these hybridised variants, 9 were exclusively clustered in the heteromorphic W chromosome, scattered throughout its highly heterochromatic arm and denoting its specificity regarding its repetitive regions. The satDNA content from *M. elongatus* amplified and differentiated in various degrees across its genome, with the W sex chromosome accounting for most of its accumulation and clusterisation pattern. We unveiled the diverse satDNA composition of the heteromorphic sex chromosome for the species, showing how this specialised and relatively recent chromosome already presents a remarkable accumulation of repetitive sequences. They might even be responsible for the already described differentiation step in the species regarding a multiple sex system.

Key words: Satellite DNA, Satellitome, repetitive sequences, heteromorphic sex chromosomes, FISH, Neotropical fish.

Introduction

Sex chromosomes are complex genetic entities present across all vertebrate clades, with extremely diverse occurrence and thought to have evolved independently various times throughout this group (BULL, 1983; GRAVES & PEICHEL, 2010). Their evolution usually starts at autosomes that differentiate with sex-determining genes and that are restricted from recombining with their homologous pairs (BULL, 1983; BACHTROG et al. 2011; WRIGHT et al. 2016). These chromosomes usually become prone to accumulation of repetitive sequences, elements that can trigger a highly differentiated morphology and result in heteromorphic chromosomes (Y or W).

This heterochromatin accumulation, followed by consequential repetitive sequences build up, precedes partial or complete recombination suppression between homologues, one of the common steps in sex chromosome evolution (CHARLESWORTH, 1991; CHARLESWORTH et al. 1994; CHARLESWORTH and CHARLESWORTH, 2005; ELLEGREN, 2011; SCHARTL et al. 2016; WRIGHT et al. 2016). A large repetitive DNA expansion is usually related to heteromorphic sex chromosomes that are in their first steps of differentiation, such as the ones in fish and amphibians (CHARLESWORTH et al. 1994; CHARLESWORTH and CHARLESWORTH, 2005; EZAZ et al. 2006; MANK et al. 2008; MANK; AVISE, 2009).

The differentiated chromosome defines two commonly known sex systems, male heterogamety (XY) and female heterogamety (ZW). These systems can be conserved and well defined inside a group, such as the XY for mammals and ZW for birds; but can also be highly variable, such as in fish and amphibians, animals that don’t have just one sex-determining system common to all species (WHITE, 1977; DE ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 2001; OGATA et al. 2008, GRAVES et al. 2008).

Chromosome-specific satellite DNA sequences can be used as cytogenetic markers, useful for characterising heteromorphic sex chromosomes, determinate their likely origins and differentiation evolution, as well as compare their occurrence between close related species (MARTINS, 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2007;

POLETTO et al. 2010; VALENTE et al. 2010; VICARI et al., 2010; PLOHL et al. 2012).

The clade of teleost fish comprises the most diverse vertebrate group, both in number of species to date and different sex-determining systems (HERPIN & SCHARTL, 2009; CHARLESWORTH & MANK, 2010; FROSE & PAULY, 2018). The group's undergoing evolution is also fast in comparison to other animals (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002), which implicates the occurrence of useful tools in their genomes to study repetitive DNA accumulation, sex chromosome differentiation and evolution of sex chromosome systems. The mechanisms regarding sex-determination and sex chromosomes in teleosts are extremely labile, where sex chromosomes can evolve multiple times within different evolutionary lineages and even undergo different steps of differentiation among close-related genus and species (MANK & AVISE, 2009; ELLEGREN, 2011).

Among the Neotropical ichthyofauna, the Anostomidae have a very conversed karyotypic structure, with their 15 described genus possessing 2n=54 chromosomes with similar chromosome morphology (GALETTI et al. 1991). The *Leporinus* was revised by Ramirez et al. (2017), that allocated the nine species that presented differentiated sex chromosomes (ZZ/ZW system) to a new genus, *Megaleporinus.* The remaining *Leporinus* comprises the species with undifferentiated sex chromosomes or those unknown cytogenetically.

The heteromorphic W chromosome in *Megaleporinus* is the biggest chromosome of the all species' karyotypes. It is subtelocentric and highly heterochromatic, unlike the Z chromosome, which maintains a similar size to the autosomes (NAKAYAMA et al. 1994; GALETTI et al., 1995; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; HASHIMOTO et al. 2009, POLTRONIERI et al. 2014). The similarity between morphology, centromere position and heterochromatin quantity across all *Megaleporinus* W chromosomes indicates a possible common evolution from the same ancestral chromosome pair (GALETTI et al. 1995; PARISE-MALTEMPI et al. 2013; RAMIREZ et al. 2017), and it is stated that this differentiation started primarily

through repetitive elements accumulation (NAKAYAMA et al. 1994; MARRETA et al. 2012).

The *Megaleporinus* had several repetitive sequences physically mapped and analysed, and had shown that the heterochromatin content and repetitive DNA distribution in the W chromosome differs among the *Megaleporinus* species, regardless of the possible common origin for this chromosome (PARISE-MALTEMPI et al. 2007, DA SILVA et al. 2012; DA SILVA et al. 2013; POLTRONIERI et al. 2014; DE BORBA et al. 2013). This shows the highly dynamic repetitive content and complexity level regarding this genus' heteromorphic chromosome (NAKAYAMA et al. 1994; MOLINA & GALETTI, 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; DA SILVA et al. 2012; MARRETA et al. 2012).

As pointed out by Parise-Maltempi et al. (2007), the repetitive elements may even be related to a *Megaleporinus elongatus* multiple chromosome system ($Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$), as they may be related to its recent origin and distinct differentiation step compared to the other *Megaleporinus.* A probe derived from microdissecting the *M. elongatus* W chromosome was isolated by Parise-Maltempi et al. (2013) and hybridised in *M. macrocephalus* and *M. obtusidens,* that also have a ZZ/ZW system. There were no hybridisation signs for other four species used in the study (*L. friderici, L. striatus, L. lacustris, Schizodon borelii and S. isognathus)*, which, in turn, do not present differentiated sex chromosomes. *M. macrocephalus* and *M. obtusidens* also showed hybridised signals in their Z chromosome, but there were no shared signals between the W and the Z from *M. elongatus.* This may indicate the high probability of another differentiation stage for this species' chromosomes.

The repetitive elements, known to be linked to such diverse and distinct sex chromosomes, make the *Megaleporinus* an useful model for studying the evolutionary dynamics of these sequences in fish genome, and to understand heteromorphic chromosomes as a whole. Although the already known presence of a sequences in the species' W chromosome and general assumption of its high content of repetitive DNA, here we performed for the first time a more in depth characterisation of the most abundant satellite DNA present in the *Megaleporinus*

elongatus female genome. Through high-throughput analysis, bioinformatic tools and chromosomal physical mapping, we focused on the satDNAs quantification, diversity and distribution concerning the species' heteromorphic sex chromosome.

Materials and Methods

Chromosomal preparations and tissues from six *Megaleporinus elongatus* specimens (3 females and 3 males) were previously obtained from Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMbio) Pirassununga, São Paulo, Brazil. The material was kept refrigerated at -4°C at the animal cytogenetics laboratory in UNESP Rio Claro and authorised for manipulation by CEUA (protocol number 3524, approval code 09/2017).

Liver tissue from one female *M. elongatus* was sent to Macrogen (South Korea) for low-coverage genome sequencing. The sequencing was carried out using the Illumina® Hiseq™ 2000 platform (2 x 101bp paired-end), which yielded 19,289,312 *reads* in total. The obtained *reads* were joined using the fastq-join software from FASTX-Toolkit using default data entry.

To search for satellite DNAs in the *M. leporinus* female genome, a graph-based *clustering* and assembly of 1000000 random *reads* was carried out using the RepeatExplorer (NOVÁK et al. 2013). Then, the possible satDNAs were manually annotated out of all the repeats *clustered* by RepeatExplorer. Repeat graph density with spherical and highly dense graph structures, typical to satDNA (NOVÁK et al. 2010, 2013) were used as first step for the searched for satDNAs. Afterward, a manual search for the consensus sequences of each *cluster* selected as satDNA was carried out analysing dotplot graphic alignment tool with the Geneious v4.8.5 *software* (basic version), identifying the monomers to confirm the tandem repeat organisation and retrieving their consensus sequence. Using MEGA v8.0 the adenine+timine content in each consensus was also measured.

The consensus sequences were analysed using the BLAST tool (http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/) to search similarities with published sequences. Two other iterations of RepeatExplorer were carried out, using 1,000,000 random *reads* each as well, in order to compare and take the average of the amount of repetitive *clusters* analysed and estimated satDNA content.

Each satDNA consensus sequence identified was used to manually design primers in opposite directions. Following the criterion suggested by Ruiz-Ruano et al. (2016) each satDNA was named accordingly, in order of decreasing abundance.

Polymerase chain reactions (PCR) using these primers were carried out in order to validate the presence of these satDNA in the female genome. The PCRs were done using female genomic DNA extracted from 5mg liver tissue, using a genomic DNA purification kit by Wizard® (Promega). The extraction followed the protocol provided by the manufacturer, with the addition of a RNA removal step using RNAse (20mg/ml) (Roche®).

The reactions, each with 10µl of final volume, contained 50ng of genomic DNA, 2mM of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Invitrogen®), 50mM $MgCl_2$ (Invitrogen®), 10x *Taq* reaction buffer (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl) (Invitrogen®), 10µM of each primer (forward and reverse) and 1U Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen®) for each satellite DNA. The PCR conditions in the termocycler included denaturation at 94°C for the initial 5 minutes, and 30 cycles at 94°C for 30 seconds, primer annealing at 55°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and 20 seconds, with a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were then visualised via 1% agarose gel, with 1 Kb Plus DNA *ladder* (ThermoFisher®) as molecular marker, and analysed with an UV transiluminator.

To generate fluorescence *in situ* hybridisation probes, amplified PCR products for each satDNA were labeled by nick translation including digoxigenin-11-dUTP (Roche®). For the FISH experiments, chromosomal preparations of mitotic chromosomes from both sexes were used, obtained from anterior kidney cell

suspension of *Megaleporinus elongatus* males and females according to Foresti et al. (1981).

The fluorescence *in situ* hybridisation analyses were performed according to Pinkel et al. (1986) protocol, with modifications by Cabral-de-Mello et al. (2010) and regarding denaturing time with 70% formamide (1m45sec at 72°C). Anti-digoxigenin-rhodamine (Roche®) was used for signal detection, and the chromosomes were counterstained with DAPI (4′,6-diamidino-2′-fenilindol) + Vectashield (Vector®). The slides were visualised via fluorescence microscopy with Olympus® BX51 and a digital camera attached (Olympus® DP71). Chromosome images were captured using DP Controller program and the merged images of both the metaphases and the signals were optimised using photo-editing *softwares* for brightness, contrast and to caption each photo.

SatDNA that had visible signals through FISH had their PCR products sequenced by Macrogen (South Korea) and later aligned in MEGA v8.0 with the manually annotated consensus to check their nucleotide composition and confirm their sequences. The satDNA sequences that hybridised in *M. elongatus* female metaphases were aligned by Muscle in MEGA v8.0 and analysed regarding their possible homologies and being grouped into the same family in case of high similarity.

Results

Satellite DNA isolation and characterisation

The female genome sequencing by Illumina platform returned a genome size of 1.95Gbp, 19,289,312 paired-end *reads* and GC/AT content of 40% and 60%, respectively. The *clustering* analysis through RepeatExplorer (NOVÁK et al. 2013) used 1,000,000 random *reads* as input and it generated 48,547 *clusters* (containing approximately 22% of *reads*) corresponding to repetitive sequences with different sizes and genomic abundance, including transposable elements, satellite DNA and non-characterized repetitive elements. The remaining 643,990 *reads* represent

singletons, the low copy number fraction genome, corresponding to 78% of the random *reads* filtered by RepeatExplorer (Figure 1). Two subsequent iterations of RepeatExplorer, using 1,000,000 random *reads* each, both resulted in 273 repetitive *clusters* (77 regarded as satDNA through graph analysis for the second iteration and 70 for the third) and were considered just for quantity comparison between the random analysed *reads* and repetitive sequences present in the sequenced genome.

The 272 most abundant *clusters,* given as output for repetitive sequences, in the first iteration were analysed. The resulting graphs with high density, typical to satDNAs, as well as subsequent dotplot analysis and manual annotation, confirmed the occurrence of 69 tandem repeat variants out of the 272 *clusters*. Their estimated abundance given by RepeatExplorer ranges from 0.011% for the least abundant, and 0.742% for the top one. These satDNA variants had repeat unit lengths (RUL) ranging from 20 to 245 bp, with a mean of 53 bp for all, and present different arrangements and molecular composition. Their nucleotide sequences showed A+T content from 30.8% to 76.2%, with the majority above 60% of its content comprised of adenine+timine (Table 1). Altogether, the manually isolated 69 satDNAs variants represent roughly 5.6% of the analysed *reads* from the female genome.

Database searches through NCBI BLAST using the consensus sequences to each satDNA, did not reveal significant similarity with previous deposited sequences, except for variants MelSat02-26 and MelSat03-26 and the Le*Spe*I, a repetitive sequence isolated from *M. elongatus* by Parise-Maltempi et al. (2007), with an identify of 96% (e-value=006.1) for both variants and the deposited Le*Spe*I clones in the database. An alignment between MelSat03-26 was done with one Le*Spe*I to confirm their similarity (Figure 2).

After *primer* designs, derived from each of the 69 consensus sequences, 53 satDNAs were recovered through PCR, showing visible bands in agarose gel, with the bigger ones revealing a ladder pattern. The PCR products were probed for fluorescence *in situ* hybridisation experiments for physical chromosome mapping.

The cytogenetic mapping of the 53 amplified satDNAs was carried out in female mitotic metaphases through fluorescence *in situ* hybridisation. Of all the tested probes, 16 satDNAs revealed visible signals on female chromosomes (Table 2), with variable distribution across both the heteromorphic sex chromosome and autosome pairs depending on the repeat (Figure 3). These satellite DNAs are amongst the most abundant of the analysed *reads* from the female genome. They aligned between each other in order to analyse possible homologies between them and being part of the same satDNA family. MelSat02-26 and MelSat03-26 comprise the same sequence (same variant) as one is the reverse complement of the other, and scoring 95.2% pairwise identity and 96.8% identical sites after the alignment. We still considered them two variants for the FISH mapping in the species' chromosomes as the variants were reversed and showed different bands when mapped in male's metaphases. For the remaining variants, none showed above 50% similarity between each other to regard being part of the same satDNA family (RUIZ-RUANO et al. 2016).

Chromosomal localisation of satDNAs

The abundance of satDNAs located in the heteromorphic W chromosome was noteworthy, with only three of them not being present in the sex chromosome and being visible only in autosomes (MelSat15-245, MelSat18-121, MelSat31-38) (Figures 3.j, 3.l, 3.o). These three satDNAs are among the bigger ones in terms of length, and are positioned in either the centromere or telomere of the autosomes, with MelSat15-245 (the biggest isolated satDNA) being hybridised in the centromeric region of at least 5 autosome pairs and MelSat18-121 possibly relating to the NOR-bearing pair).

In the heteromorphic sex chromosome, the distinct satDNA variants were distributed across most of its length, hybridising either on the telomeric, centromeric and/or intersticial blocks of the highly heterochromatic bigger arm (Figure 4), corresponding to the C-band positive analysis (GALETTI et al. 1995). The signal blocks were present in either a single or multiple bands, with highly condensed fluorescent signals. Four satDNAs (MelSat02-26, MelSat03-26, MelSat07-177,

MelSat23-52) were not exclusive to the W_1, also located in multiple autosomes, either in their centromere, distal blocks in the small arm or in intersticial positions (Figures 3.b, 3.c, 3.f, 3.m). The remaining sex chrosomome Z_1, and both Z_2 and W_2, are particularly difficult to identify given their sizes being the same to the autosomal chromosomes, so we considered their FISH signals also as “autosomes” when tabling their occurrence.

MelSat02-26 and MelSat03-26 showed signal distributions slightly similar to the repetitive DNA Le*Spe*I mapped by Parise-Maltempi et al. (2007), with three distinct blocks in the W chromosome and the same pattern in an autosomal pair, which made us assume it was the Z_2, and the W_2. The BLAST search returned relevant matches for both satDNA variants and all three Le*Spe*I clone sequences deposited in the NCBI database, and their sequences were aligned with the three Le*Spe*I sequences (accession EF107659.1, EF107660.1 and EF107661.1) confirming their similarity. MelSat03-26 is an exact match to part of Le*Spe*I sequence, from base 249 to 275 (Figure 2). This confirmed the FISH signals in the multiple sex chromosomes for these two satDNA variants.

For both satDNAs, however, the hybridisation patterns showed different signals in Z_2 compared to Le*Spe*I; MelSat02-26 and MelSat03-26 had three distinct blocks in both Z_2W_2, just like in W_1; for Le*Spe*I, however, only the distal portion of the smaller arm of Z_2 showed FISH signals (PARISE-MALTEMPI et al. 2007).

These two satellite variants were also probed and hybridised in male *Megaleporinus elongatus* metaphases (Figure 5), with MelSat02-26 not showing any visible signals (Figure 5a) and MelSat03-26 hybridising in an autosomal pair at the distal portion of the p arm, similar to Le*Spe*I (Figure 5b). The fact that the MelSat02-26 variant is presented in the reverse complement form of MelSat03-26 could be the reason it did not hybridise in the male.

Discussion

We recovered 69 satellite DNA variants through means of graph-based clustering analysis of sequenced *reads* from *Megaleporinus elongatus* female

genome, followed by manual annotation and complementary investigation. The variants comprise relatively small sequences, with variable molecular compositions and corresponding to 5,6% of the total analysed genome *reads.* Despite being less abundant when compared to other repetitive elements, as 22% of the *reads* were clustered as overall repetitive sequences according to RepeatExplorer, the satDNA families were present in the top most abundant *clusters*. Thus, it is safe to say that, although not as representative as other repetitive classes in terms of quantity, the satDNAs still bear relevance in *M. elongatus* female genetic material.

The majority of the isolated variants were non-visible through FISH and, therefore, likely in non-clustered patterns in the chromosomes. As observed by Ruiz Ruano et al. (2016) and analysed by Duílio et al. (2017) in the satDNA library from the fish *Astyanax paranae,* satDNA size is not directly related to it being present in a clustered pattern in the genome or not. This also applies to the observed satDNAs for the *M. elongatus* female, as most variants (despite their length) are not accumulated enough for visible clusterisation patterns, and the ones that did show physical signals have variable sizes (Table 2), including smaller ones such as MelSat04-20 and MelSat06-24 (20bp and 24bp, respectively).

Regarding the 16 variants that presented FISH signals in *M. elongatus* female chromosomes, most of these showed remarkable clusterisation patterns in the heteromorphic W chromosome, being well-distributed specifically in the q arm, and endorsing the positive C-banding for its highly heterochromatic content (GALETTI & FORESTI, 1988; GALETTI et al. 1995). This distribution parallels the chromosome's exclusive non-recombining region, most likely residing in the q arm. This large repetitive content in the suppressed region was already suggested for heteromorphic sex chromosomes in general (CHARLESWORTH, 1991). Furthermore, the lack of clusterisation on most of the karyotype as a whole, including the Z chromosome, reinforces the sequences' high diversification and exclusive clusterisation in the heteromorphic W, marking the bigger arm as the probable structure harbouring the sex-determining genes for the species.

The diverse distribution in the heteromorphic W showed different clusterisation blocks across the q arm, with some variants restricted to one FISH band (Figure 3.d) and others distributed as three separate bands (Figure 3.. The satDNA *clusterisation* process occurring in this heteromorphic chromosome does not follow an organised fashion, with the quick repetitive accumulation process reflecting in the scattered and heterogeneous distribution in the exclusive sex chromosome region.

The few satDNAs that hybridised in autosomes, apart from MelSat02-26 and MelSat03-26, did not show the distinct Le*Spe*I pattern (PARISE-MALTEMPI et al. 2007), being restricted to either centromere or telomere regions. The variants with centromeric clusterisation in autosomes, MelSat07-177, MelSat15-245 and MelSat31-38 have relatively different A+T composition, with 69.4%, 52.8% and 42.9% respectively (Table 1), and their occurrence aren't restricted to only one autosomal pair (Figure 3.f, 3.j, 3.o).

It is interesting to notice that MelSat07-177 and MelSat15-245 are amongst the biggest variants in length, and present centromeric distribution in autosomes. MelSat07-177 was also clustered in the heteromorphic W centromere, showing its shared accumulation between the sex chromosome and the autosomal pairs, indicating its potential role as centromeric repetitive even in the sex chromosome. MelSat18-121 is also a good example, as it was clusterised specifically in one pair's telomeric region (Figure 3.l), possibly the NOR-bearing pair.

In *Megaleporinus elongatus* case*,* few repetitive sequences were already isolated and physically mapped in the heteromorphic W chromosome, such as Le*Spe*I (PARISE-MALTEMPI et al. 2007) Le*Spe*II (DA SILVA et al. 2012) and some standard microsatellites (POLTRONIERI et al. 2014). According to Parise-Maltempi et al. (2007), *M. elongatus* might be on a distinct differentiation process of multiple sex chromosomes $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ when compared to the rest of the genus. This was observed after the physical mapping of Le*Spe*I repetitive sequence on both sexes. The same distribution pattern was observed for the MelSat02-26 and MelSat03-26 variants (Figure 3.b, 3.c), both being sequence fragments of Le*Spe*I. The fact that Le*Spe*I, then, corresponds to one of the most abundant repetitive element regarding

the analysed *reads* in the present work. What is interesting to notice is that, although being a sequence fragment of Le*Spe*I, MelSat03-26 presented three distinct signal blocks for both Z_2W_2, same pattern as W_1. This could mean different *clusterisation* of this repetitive element, with dynamic accumulation between individuals.

Megaleporinus elongatus lineage diverged ~2.5Myr from its close related species (RAMIREZ et al. 2017), which may indicate the state of multiple sex chromosomes as being an even more derived trait in comparison to the simple ZZ/ ZW system. The difference between this multiple system and the simple ZZ/ZW is the lack of further heterochromatinization on the multiple pairs (DE ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 2001; MARTINS, 2007; DE OLIVEIRA et al. 2007; SCHARTL et al. 2016), as the female W_2 does not present an increase of heterochromatin content in the q arm (PARISE-MALTEMPI et al. 2007). The quick differentiation through repetitive accumulation that occurred in the genus as a whole might reflect the satDNA duplication and establishment in different chromosomes apart from the heteromorphic one, resulting in their eventual role in the sex system, as seen in the present work for MelSat02-26 and MelSat03-26 distribution.

According to Ramirez et al. (2017), the most recent common ancestor for the genus possessing the ZZ/ZW system dates from ~9.27Myr-12Myr, a relatively recent event in comparison to other sex systems, corroborating the state of young sex chromosomes that may be found in fish (EZAZ et al. 2006; MANK & AVISE, 2009). As shown by the same authors in the recent *Megaleporinus* reclassification, the presence of a sex chromosome system can be regarded as a relevant phylogenetic trait when analysing Neotropical fauna, or fish in general. The sex chromosome differentiation process can lead to a different genus or a group dismemberment (what eventually happened to the previous *Leporinus* group), and their analysis helps investigate chromosomic and genomic evolution and patterns regarding genetic sex determination and the content of these specialised chromosomes.

The present work was the first attempt to isolate a large amount of satellite DNA variants, directly from sequenced genome *reads,* and map them on the female karyotype, focusing on the heteromorphic sex chromosome content. We unveiled the

diverse distribution of satDNAs in the heteromorphic sex chromosome of the species, showing its abundant occurrence and relating to the recombination-supressed region that led the W_1 chromosome acquire such remarkably different morphology from the rest of the karyotype.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. They also thank Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMbio) for providing individuals for chromosomic preparations.

References

BACHTROG, D.; KIRKPATRICK, M.; MANK, J. E.; MCDANIEL, S. F.; PIRES, J. C.; RICE, W.; VALENZUELA, N. Are all sex chromosomes created equal?. **Trends in Genetics**, *27*(9), 350-357. 2011.

BULL, J.J. et al. **Evolution of sex determining mechanisms**. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., 1983.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393-400, 2010.

CHALOPIN, D.; VOFF, J-N.; GALIANA, D.; ANDERSON, J. L.; SCHARTL, M. Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. **Chromosome research**, v. 23, n. 3, p. 545-560, 2015.

CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. **Science**, v. 251, n. 4997, p. 1030-1033, 1991.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215, 1994.

CHARLESWORTH, D.; MANK, J. E. The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. **Genetics**, v. 186, n. 1, p. 9-31, 2010.

CONDE-SALDANA, C. C.; BARRETO, C. A. V.; VILLA-NAVARRO, F. A.; DERGAM, J. A. An Unusual Accumulation of Ribosomal Multigene Families and Microsatellite DNAs in the XX/XY Sex Chromosome System in the Trans-Andean Catfish *Pimelodella cf. chagresi* (Siluriformes: Heptapteridae). **Zebrafish**, *15*(1), 55-62. 2018.

DA SILVA, E. L.; DE BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 91-100, 2001.

DE OLIVEIRA, E. A.; SEMBER, A.; BERTOLLO, L. A. C.; YANO, C. F.; EZAZ, T.; MOREIRA-FILHO, O.; HATANAKA, T.; TRIFONOV, V.; LIEHR, T.; AL-RIKABI, A. B. H.; RÁB, P.; PAINS, H.; CIOFFI, M. B. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY_1Y_2system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). **Chromosoma**, *127*(1), 115-128. 2018.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3, p. 191-364, 2002.

DUÍLIO, M. D. A.; UTSUNOMIA R.; RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus Astyanax. **Scientific Reports**, *7*(1), 12726. 2017.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 3, p. 157, 2011.

EZAZ, T.; STIGLEC, R.; VEYRUNES, F.; GRAVES, J. A. M. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. **Current Biology**, v. 16, n. 17, p. R736-R743, 2006.

EZAZ, T.; SRIKULNATH, K.; GRAVES, J. A. M. Origin of amniote sex chromosomes: an ancestral super-sex chromosome, or common requirements?. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 1, p. 94-105, 2016.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, *31*(3), 137-144. 1981.

FROESE, R.; PAULY, D. "**FishBase. World Wide Web electronic publication**." 2018. Disponível em: www.fishbase.org. Acesso em: 06/2018

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 43, n. 1-2, p. 43-46, 1986.

GALETTI JR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, v. 44, n. 3-4, p. 287-292, 1991.

GALETTI JR, P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A Monophyletic ZW Sex Chromosome System in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, n. 4, p. 375-382, 1995.

GRAVES, J. A. M.; PEICHEL, C. L. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options?. **Genome biology**, v. 11, n. 4, p. 205, 2010.

GRAVES, J. A. M. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 565-586, 2008.

HASHIMOTO, D.T.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 124, n. 2, p. 151-157, 2009.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: insights from the medaka fish (*Oryzias latipes*). **Molecular and cellular endocrinology**, v. 306, n. 1, p. 51-58, 2009.

MANK, J. E. Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism: lessons from the genome. **The American Naturalist**, *173*(2), 141-150. 2008.

MANK, J. E.; AVISE, J. C. Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. **Sexual Development**, v. 3, n. 2-3, p. 60-67, 2009.

MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE−MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of fish biology**, v. 80, n. 3, p. 630-637, 2012.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

MOLINA, W. F.; GALETTI, P. M. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). **Genetica**, v. 130, n. 2, p. 153-160, 2007.

NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, n. 1, p. 31-39, 1994.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based *clustering* and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 378, 2010.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence *reads*. **Bioinformatics**, v. 1, p.1-2, 2013.

OGATA, M.; HASEGAWA, Y.; OHTANI, H.; MINEYAMA, M., MIURA, I. The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog *Rana rugosa*. **Heredity**, v. 100, p. 92–99. 2008.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; DIAS, G. B.; DE LIMA, L. G.; CAMPOS, G.; KUHN, S.; RAMOS, E.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 6422, 2017.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.: 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**, 116:218–223, 2007.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; SILVA, E. L.; RENS, W.; DEARDEN, F; O´BRIEN, P. C. M.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M. A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Repetitive DNA**. Karger Publishers, p. 126-152, 2012.

POLETTO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L. A. C.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 142, n. 1, p. 40-45, 2014.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.O.; GALETTI JR, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 308-323, 2017.

REICHWALD, K.; LAUBER, C.; NANDA, I.; KIRSCHNER, J.; HARTMANN, N.; SCHORIES, S.; GAUSMANN, U.; TAUDIEN, S.; SCHILHABEL, M. B.; SZAFRANSKI, K.; GLOCKNER, G.; SCHMID, M.; CELLERINO, A.; SCHARTL, M.; ENGLERT, C.; PLATZER, M. High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*: a new vertebrate model for aging research. **Genome biology**, v. 10, n. 2, p. R16, 2009.

RUIZ-RUANO, F.J., LÓPEZ-LEÓN, M.D., CABRERO, J. and CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, p. 28333, 2016.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.

STEFLOVA, P.; TOKAN, V.; VOGEL, I.; LEXA, M.; MACAS, J.; NOVAK, P.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Contrasting patterns of transposable element and satellite distribution on sex chromosomes (XY1Y2) in the dioecious plant *Rumex acetosa*. **Genome biology and evolution**, v. 5, n. 4, p. 769-782, 2013.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETTO, A. B.; FANTINATTI, B. E. A.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 133, n. 1, p. 34-42, 2010.

VICARI, M. R.; NORAGOTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

WHITE, M. J. D. **Os cromossomos**. Ed. Nacional, 1977.

WRIGHT, A. E.; DEAN, R.; ZIMMER, F.; MARK, J. E. How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, p. 12087, 2016.

YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; EZAZ, T. TRIFONOV, V.; SEMBER, A. LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae). **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 276, 2017.

Table 1 - Isolated satellite DNA variants from *Megaleporinus elongatus* female and their main characteristics, as well as the subsequent designed *primers.*

Cluster	**satDNA variant**	**Consensus sequence**	**Length (bp)**	**A + T (%)**	**Genome/ *Reads* Proportion (%)**	**Designed *Primers***	
						Forward	**Reverse**
CL_1	MelSat01-36	CATTATCAGTACTTTCTACTCCTTACATTTACACTC	36	66.7	0.742	ATTTACACTCCATTATCAGT	TAAGGAGTAGAAAGTACTG
CL_2	MelSat02-26	TCGCTCGCTCCGTGTTCGTTCCGCGT	26	34.6	0.533	CGTTCGCTCGCTCCGTG	AACGAACACGGAGCGAGC
CL_3	MelSat03-26	AGCGAACGCGGAACGAGCACGGAGCG	26	30.8	0.508	GGAGCGAGCGAACGCGGA	TGCTCGTTCCGCGTTCGCT
CL_4	MelSat04-20	GTAGTGGTTAGTACGGTGGT	20	50	0.507	TACGGTGGTGTAGTGGTTAG	CTAACCACTACACCACCGTA
CL_5	MelSat05-21	TTTATATCCTGTGACAGTTTC	21	66.7	0.506	CTTTATATCCTGTGACAGT	AAACTGTCACAGGATATAAA
CL_7	MelSat06-24	TGGTAGTGTACTAAAACGTTTGAC	24	62.5	0.472	ACGTTTGACTGGTAGTGTA	TTTAGTACACTACCAGTCAA
CL_20	MelSat07-177	ATCACAATTTGAGGTCCCATAAAATAGACAAATCAAATTGTTATCAAATTATACCAGCATATTCCTGAAGAACACTCTCTCTTGTACCCATGCTATGATGAACAAGTAATTTTACTGTAGGAATTTGGAGTAATGCGATGACAAA	177	69.4	0.279	ACACTCTCTCTTGTACCCAT	TCTTCAGGAATATGCTGGTATA
CL_21	MelSat08-37	TTACAGTTTACCTGTACACAGGTAGGTGAAGGTAGTG	37	58.3	0.265	AGGTGAAGGTAGTGTTACAG	ACCTGTGTACAGGTAAACTG
CL_27	MelSat09-42	AACACCTACCTTGTACTTCCACTAACTGGCCACTTTATTAGA	42	55.6	0.216	AGAAACACCTACCTTGTACT	AATAAAGTGGCCAGTTAGTG
CL_33	MelSat10-25	GGTTAGGGTTTAGTGTAAATGTAGG	25	60	0.173	GGGTTTAGTGTAAATGTAGG	TAACCCCTACATTTACACTAA
CL_35	MelSat11-61	TGAGAAACTGTAACTCAGTTTATATACAATACCTACATTTAGAGTTATACATTCAACCTAA	61	69.4	0.152	ACCTACATTTAGAGTTATA	ATTGTATATAAACTGAGTTA
CL_42	MelSat12-37	GTTATACTCCAGACCCCTATATCAGCTATCAGACACT	37	55.6	0.132	CTGTTATACTCCAGACCCC	GTCTGATAGCTGATATAGGG

CL_43	MelSat13-67	CTGGATTATAATC ACTCCACAGTTAT TACTGTCAGACTG TAAACACTACACA CACTGCAGATTCA TA	67	63.9	0.132	ACTGTAAACACTACA CACAC	CTGACAGTAATAACT GTGGA
CL_51	MelSat14-51	TGTAAAAGCACTA CTTACTCTATTAAT ACTGTTTAATATTT AATAATAAAG	51	75	0.113	ATATTTAATAATAAAG TGTAAA	TAAACAGTATTAATAG AGTA
CL_52	MelSat15-245	GTTTCTGACGCTT CTAAGCCCTTAGA AAGCGTTTGGAG TGCAGAAGGCGC TTTTTCACTGTTT TACTGCGAGTAGA ATGACTTTTGCAA TCAAAGGCAGAT CACTCCACCAAC TTGAATGTTGCAC CTACATATCTGGT	245	52.8	0.111	GAATGTTGCACCTAC ATATC	AAGTTGGTGGAGTGA TCTG
CL_58	MelSat16-43	GTATTACAGCTTC TGTTCTTTTCAGT GTTTCAGTATTCA GCCT	43	66.7	0.104	TTCTGTTCTTTTCAG TGTTTC	GCTGTAATACAGGCT GAATA
CL_59	MelSat17-39	CACTGTTCCTTCA TCCCTTCATTCCT TTATCATCACCAA	39	58.3	0.101	TCATCCCTTCATTCC TTTATC	AGGAACAGTGTTGG TGATGA
CL_66	MelSat18-121	TGCATTTAAAACA CTTTTAATCCAGC AGGGAGCATCCT CATGACCTCTGC GGGGATTTAGAG CACCAAAGGCGG CCTACTGTAAGGC TCATGACCCCCA GAAGTGGCTTATT CCATAGCAG	121	61.1	0.095	ATGACCTCTGCGGG GATTTA	AGGATGCTCCCTGCT GGAT
CL_74	MelSat19-22	GTTGATCACTGTA ATGGTCAGA	22	59.1	0.081	TTGATCACTGTAATG GTCAGA	CTCTGACCATTACAG TGATC
CL_82	MelSat20-25	TTTTGATTTCTTG TCCTTCTTCAGA	25	68	0.075	TCAGATTTTGATTTC TTGTC	AGAAGGACAAGAAAT CAAAA
CL_83	MelSat21-34	AATGAGTACACTT CTATACTTCACCT ACTACACT	34	64.7	0.075	CACTAATGAGTACAC TTCTA	TAGTAGGTGAAGTAT AGAAG
CL_93	MelSat22-61	CTTCCCTCTCTAT CTAATCTAACCAC AGCTCGGTTTAAA CACCGTCTACTC GACCAGACCG	61	55.6	0.061	GTTTAAACACCGTCT ACTCG	CGAGCTGTGGTTAGA TTAGA
CL_94	MelSat23-52	AGTTTAGTCATTG TCTGTTGTTTATG GAGTTTAGTGTGT CTGAATATGTACC	52	66.7	0.059	AATATGTACCAGTTT AGTCA	CAGACACACTAAACT CCAT
CL_98	MelSat24-30	ACTGAGAGCTGA TTGGTTAGTATTA CTGCT	30	60	0.056	GGTTAGTATTACTGC TACTGA	AATCAGCTCTCAGTA GCAGT
CL_108	MelSat25-21	ATTATTCAGAATCT ACTACTA	21	76.2	0.051	AATTATTCAGAATCTA CTAC	AGTAGTAGATTCTGA ATAAT

CL_110	MelSat26-46	GCTACAGTATAGTGTAGCTCAAACAACCGGATCAGAAAACCAGATA	46	57.1	0.051	AACCAGATAGCTACAGTATA	TTCTGATCCGGTTGTTTGA
CL_114	MelSat27-26	ATTTTGGTGTGCTTAAGTTTTAATTA	26	71.4	0.049	GTTTTAATTAATTTTGGTGT	TTAAGCACACCAAAATTAA
CL_115	MelSat28-50	TTTAGAGGGCGGTGGTGAGTGATGTGTGTTTATTTGATGTTAATAACTCC	50	42.9	0.047	TTTGATGTTAATAACTCCTTT	TAAACACACATCACTCAC
CL_125	MelSat29-44	ACAGAACCCTTAAAGAAAGAGTGTACATGAGCGTTCCCTTTACT	44	61.9	0.043	TACTACAGAACCCTTAAAGAA	AAGGGAACGCTCATGTACA
CL_128	MelSat30-39	GGAGTGAGGGTCAGTATGACTGTGGATTAGACACATAGA	39	47.6	0.042	AGGAGTGAGGGTCAGTATGA	CTATGTGTCTAATCCACAGTC
CL_131	MelSat31-38	GTCTGTATACCAGCCTGCACCAGTAAGAGTCTTCACCT	38	42.9	0.040	CCTGCACCAGTAAGAGTCT	TGGTATACAGACAGGTGAAG
CL_134	MelSat32-62	GCCTAAATATCATCATAAAACTGTACTACCTGTATTTAAACCATAGGTAGGATAATTTGATA	62	71.4	0.040	TTTAAACCATAGGTAGGATA	TACAGGTAGTACAGTTTTAT
CL_135	MelSat33-31	TGTTTCAGAGTGGTCAGTTTTACTGGTTTAC	31	61.9	0.040	CAGTTTTACTGGTTTACTGTT	ACCACTCTGAAACAGTAAAC
CL_138	MelSat34-127	GGGCCATACTAGTACTGGATGCATCTGCAGGATATCGCGGCCGCGTCTTCAGAGGGGGATAGCATGACCTCACGCCTTCTATAAAAGCCCTCCCTTAGTCTTTTGATTATCCCATGACATTACACTT	127	47.6	0.039	GTCTTCAGAGGGGGATAGCA	GCGGCCGCGATATCCTGC
CL_141	MelSat35-118	ACTAGTATGGCCCGGGGGATCCTAGAGACCATTCGCGATTCCATGAGACTCCAAGGGTTCTGCACAACTTATGCACCTCTATTAGATCATTGTGTTCTACGAAGCCTGGACTGCATTA	118	38.1	0.039	GAGACTCCAAGGGTTCTGC	ATGGAATCGCGAATGGTCTC
CL_142	MelSat36-151	ACTAGTATGGCCCGGGGGATCCTTATCTGTCAAAACCGCTAATGTCCGTTCTAAGACCGTCTGGAGAACACTTGCCCATCAGTGCTTTTGAACCTTTTTTTCACAGGTCCCTTCCGATTACACTGAGAAGCTGACCACACCTGCTAGAAGA	151	38.1	0.039	AACACTTGCCCATCAGTGCTT	CTCCAGACGGTCTTAGAACG

CL_143	MelSat37-153	ACTAGTATGGCCCGGGG GATCCGTATACGTTTCTA ATTTGTAGTTAACGGTTG GATACCACTTTGAGGCA TGTAATATGGTACTGAGC TTCGGCACAGGGCTCA AATTGCATCATTAAATGT CTCCGATGTGGCTATAT GTCATGGATAAAGG	153	38.1	0.038	GTACTGAGCTTCG GCACA	TATTACATGCCTC AAAGTGG
CL_144	MelSat38-161	GGGCCATACTAGTACTG GATGCATCTGCAGGATA TCGCGGCCGCAGAAGA CCTAAGCTAGCGTTTAG AGTGCAATTTTGTCAGC AGCCATACTCTAAGCCC TGTTTTTAAGTACCCAG GAAGCCAGAATAGTCTT GAGAAGGGAGGAAATT GCTGGGCAGC	161	47.6	0.038	CATACTCTAAGCC CTGTTTTA	GCTGCTGACAAAA TTGCACT
CL_147	MelSat39-30	ACAGACACTGGGAGAC CATACAAACTCCAC	30	47.6	0.036	ACACAGACACTG GGAGACCA	GGAGTTTGTATGG TCTCCCA
CL_149	MelSat40-41	TGAGAGATCTGAAAGAA ATCAGAGTAAGAGTATAT ATACAC	41	66.7	0.035	AGAAATCAGAGTA AGAGTAT	TTCAGATCTCTCA GTGTA
CL_150	MelSat41-90	ACATCCTCATTATTCTTT TAATGTTCATTCAGTTCA GTACTCAGTTTAATAATC ACTACTGACTACTGATAA ACTCATTTACACCATCAA	90	76.2	0.035	TTATTCTTTTAATG TTCATTCAG	TGAGGATGTTTGA TGGTGTA
CL_153	MelSat42-35	TCTGGAGGAGAAGGTA GTTCTTGAGTAGAAGGA CG	35	52.4	0.034	GAGAAGGTAGTTC TTGAGTA	CTCCAGACGTCCT TCTAC
CL_154	MelSat43-29	AGCTAAACTGCTGTAGA CTGAATGGGTGG	29	57.1	0.034	GGAGCTAAACTGC TGTAGAC	ACCCATTCAGTCT ACAGCAG
CL_169	MelSat44-65	ATTTATCAGTCTACTCAG ACTTTAGCAGAGCTCAG TAACACTGAGATTAATAA CTGATCACATTG	65	66.7	0.029	TCAGTAACACTGA GATTAATA	CTCTGCTAAAGTC TGAGTA
CL_174	MelSat45-31	GTGGAGTGGTGTAAAG CTCCACCACTGGACT	31	47.6	0.027	TGGACTGTGGAGT GGTGTAAA	GTGGTGGAGCTTT ACACCAC
CL_176	MelSat46-27	ATCTCCTCCACTCTGTT CTTCACCTCC	27	52.4	0.025	GTTCTTCACCTCC ATCTCCT	AGAGTGGAGGAG ATGGAGGT
CL_178	MelSat47-21	TCAGACTTTCATTCCATA TTC	21	66.7	0.025	CATATTCTCAGACT TTCATT	GAATGAAAGTCTG AGAATAT
CL_179	MelSat48-28	AGTATATACTGCATCTGC ATACTCCATC	28	66.7	0.024	ATCTGCATACTCC ATCAG	AGTATATACTGATG GAGTAT

CL_181	MelSat49-52	AGTGTATAGGAGTGTTTATTGAGGGTGTTTATGGACTAATATCTCCTATTCT	52	66.7	0.023	TATTCTAGTGTATAGGAGTG	GGAGATATTAGTCCATAAAC
CL_193	MelSat50-20	CAGTTACTGCATATTTCACT	20	65	0.020	CTCAGTTACTGCATATTTCA	TGAAATATGCAGTAACTGAG
CL_197	MelSat51-39	TCTTTCAACCAGCTCACAGCTCAACCCTACAACATTCAC	39	52.4	0.019	CACAGCTCAACCCTACAAC	GCTGGTTGAAAGAGTGAATG
CL_198	MelSat52-22	GGGTAGATTATTGGGTTGATTT	22	61.9	0.019	GGTAGATTATTGGGTTGAT	CAAATCAACCCAATAATCTA
CL_206	MelSat53-84	TGTGGGAAGAGTTTTACTAAACAAAGTCATCTCCAAATACACCAGCGCATCCACACAGGAGAGAAACCGTATCACTGCTCAGAG	84	66.7	0.017	ACCAGCGCATCCACACA	GTATTTGGAGATGACTTTGT
CL_210	MelSat54-64	AACCATATACTAAAATATCCATATACTGAAATATCCGTATACTACAGCATACATACAGTAAATT	64	76.2	0.017	GCATACATACAGTAAATTAA	GTAGTATACGGATATTTCA
CL_212	MelSat55-29	CTCTCCTCCACTGACCATCACTGCTGTTC	29	42.9	0.017	CACTGCTGTTCCTCTCCTCC	ATGGTCAGTGGAGGAGAGGA
CL_217	MelSat56-32	AGGAGTTTACTGTGATTGACTGACAGTGTAGG	32	61.9	0.016	CAGTGTAGGAGGAGTTTAC	CAGTCAATCACAGTAAACTC
CL_219	MelSat57-49	TTACACTATACCCAGTATTATCCTACCCAGTACAATATTACACCCAGTA	49	71.4	0.015	TATTATCCTACCCAGTACAAT	CTGGGTATAGTGTAATACTG
CL_226	MelSat58-32	GTCACAAGCTTCAAATTAAAGATGTAATACCT	32	66.7	0.015	TACCTGTCACAAGCTTC	TTACATCTTTAATTTGAAGC
CL_227	MelSat59-31	TAACCTCAGTATCCAAACCTAAACCTAACCT	31	61.9	0.015	CTAAACCTAACCTTAACCTC	GTTTGGATACTGAGGTTAAG
CL_233	MelSat60-32	GACTAATCTAGACCCTCTCCAACATACACCTG	32	52.4	0.014	CCCTCTCCAACATACACC	TAGATTAGTCCAGGTGTATG

CL_234	MelSat61-67	CATTAACCTAACATAGGTTACTTTAGTGGAGTTTAAATACAGTCATGAACCGGGGTACTTAGTTTAG	67	66.7	0.014	ACATAGGTTACTTTAGTG	GGTTAATGCTAAACTAAGTA
CL_240	MelSat62-30	GAGTATCTAAACCTGGATTAATCACAGTCT	30	66.7	0.013	CTGGATTAATCACAGTCTG	TTTAGATACTCAGACTGTGA
CL_241	MelSat63-60	CATTCTGGCCTAGCTTCTTGTTTGAATTTTCCCATTCCACCTTAAATGATGCAGCAATTA	60	52.4	0.013	TTTGAATTTTCCCATTCCACCT	CAAGAAGCTAGGCCAGAATG
CL_245	MelSat64-53	TACTGAACTCAGAACTGAACTGACCCTACAGGACTCAGAACAGCTAGTAATAT	53	61.9	0.012	CTCAGAACAGCTAGTAATAT	CTGTAGGGTCAGTTCAGT
CL_251	MelSat65-30	ATCTTTAACCCTCAACATAACATTCATACC	30	66.7	0.012	ACCCTCAACATAACATTCATA	TAAAGATGGTATGAATGTTATG
CL_253	MelSat66-74	CACTTTCAAGGTACAATAGTCCCCAAATACAGTTTTGGATTAAGAAGTACTTTAATCCATTCAGGGTGGACAGA	74	61.9	0.012	GGTGGACAGACACTTTCAA	CTGAATGGATTAAAGTACTTC
CL_256	MelSat67-61	TAATACAGTGTTCAGGTATGTTACTGAATGATCTGCTGAGAGTCTACAGGCTTTATTAGTG	61	66.7	0.011	ACTGAATGATCTGCTGAGA	AACATACCTGAACACTGTAT
CL_260	MelSat68-23	ATTTATTCTCAGTATGAACTTAT	23	76.2	0.011	TCTCAGTATGAACTTATAT	ATAAATATAAGTTCATACTG
CL_262	MelSat69-26	CACTATATAGACTGTTCTGTGTAGAA	26	65.4	0.011	GTGTAGAACACTATATAGA	AGAACAGTCTATATAGTGT

Table 2 - Chromosome localisation of the *clustered* satDNA variants in *M. elongatus* female metaphases. Hyphen indicates the absence of FISH signals. C: centromeric position; D: distal; I: interstitial; T: telomeric.

SatDNA	Chromosome localisation	
	Sex chr (W1)	Autosomes
MelSat01-36	I	-
MelSat02-26	T, I	D, I (1 pair)
MelSat03-26	T, I	D, I (1 pair)
MelSat04-20	C, I	-
MelSat06-24	I	-
MelSat07-177	C	C (4 pairs)
MelSat08-37	I	-
MelSat10-25	T	-
MelSat13-67	I	-
MelSat15-245	-	C (7 pairs)
MelSat16-43	C	-
MelSat18-121	-	T (1 pair)
MelSat23-52	I	I (1 chromosome)
MelSat24-30	T	-
MelSat31-38	-	C (1 pair)
MelSat33-31	I	-

Figure Legends

Figure 1. RepeatExplorer output histogram for the analysed random *reads* from the female genome. The 356010 *reads* (to the left, in pink) were grouped into 48547 repetitive clusters, comprising approximately 22% of the analysed total *reads.* From these, the top 247 clusters were given as output files for the manual annotation. The remaining 643990 *reads* (right, in green) were deemed singlets and were not *clusterised.*

Figure 2. Sequence alignment of MelSat03-26 variant with Le*Spe*I clone (EF107661.1) (PARISE-MALTEMPI et al. 2007). Gap at position 269 indicates the single nucleotide difference between the sequences. Pairwise identity: 96.2%; Identical Sites: 99.8%.

Figure 3. Chromosome mapping of *clustered* isolated satDNA variants, in mitotic metaphases of *Megaleporinus elongatus* female specimens (a-p). Arrow indicates the heteromorphic sex chromosome (W_1) and arrowheads indicate FISH signals on autosomal pairs. Bar = 10μm.

Figure 4. Ideogram of the heteromorphic W chromosome (W_1) with the *clusterised* satDNA variants and their according positions. The color coded bands are for each hybridised variant, depicting the more than one signal block when that was the case for that satDNA. The p and q arms are also identified.

Figure 5. Physical mapping of MelSat02-26 an MelSat03-26 satDNA variants in mitotic metaphases of *Megaleporinus elongatus* male. For MelSat02-26 (a) there were no *clustered* signals, and for MelSat03-26 (b) the arrowheads indicate FISH signals on autosomal pair similar to Le*Spe*I (PARISE-MALTEMPI et al. 2007). Bar = 10μm.

Figure 1

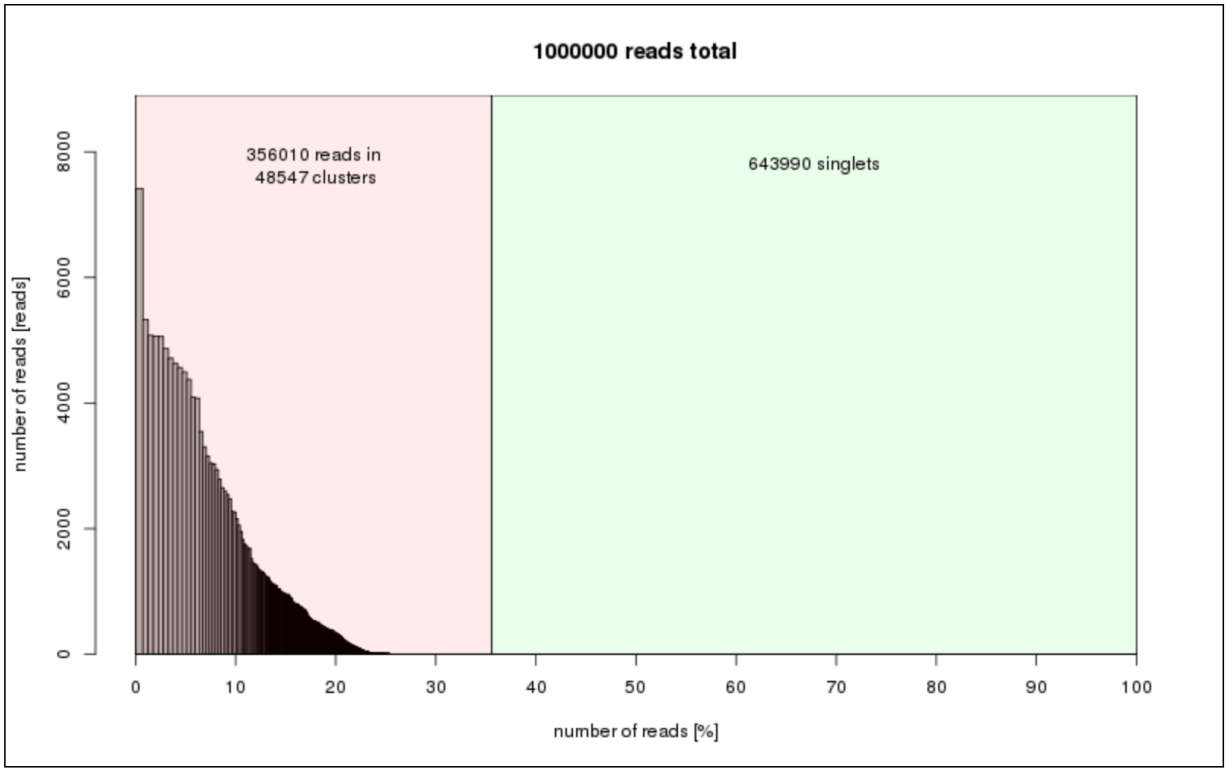

1000000 reads total
356010 reads in
48547 clusters
643990 singlets
number of reads [reads]
0
2000
4000
6000
8000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
number of reads [%]

Figure 2

```
>MelSat03 Alignment of 2 sequences: MelSat03-26, EF107661.1

Identities = 25/623 (4%), Positives = 25/623 (4%), Gaps = 597/623 (95%)

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1       1 TCATGGTGCAATCAAACGTAATAGGCATGTTATCAATANNNTTTATTGGAAAGTAAACGT  60

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1      61 ACATGAATGAAAACAAGTCGAAATGAAATAGGAGTAACCAGCGAACGCTGAACGAACACG 120

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     121 GAGCGAGCGAACGCGGAACGAGCACCGAGTGAGCGAGCGTGGAACGAGCACGGAGCGAGC 180

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     181 GAGCACCGAGCAAAGGAACGTCGGGCGAACACTGAGCGAGCGAACGCCGAGGGAGCAAGC 240

MelSat03-26      1 ---------AGCGAACGCGGAACGAGCACGGAGCG-------------------------  26
                             AGCGAACGCGGAACGAGCAC GAGCG
EF107661.1     241 ACCGAGTGAGCGAACGCGGAACGAGCACCGAGCGAGCGAGCCGAAACAATCAAGGAGCGA 300

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     301 GCGAGCAAGTGCACTAANCCCACCTCCCCAAAAAAAAAACATTCTTCTAAAAGTCNTAAT 360

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     361 GACTATAATGTNGTATTAAAATGCCNATTAAACATGAAAGTATTTTAGANCAATACAAAT 420

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     421 TTTTTAAATAACCNTTTATTGTGGNACTACTGGAGCTTTTACATTATTGTTTCATGTAGC 480

MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

EF107661.1     481 GGGAAGATATTGTTGACTAGATCCATATTGACTGAGTTAGATCCTCTAGAGTCGAACCTG 540

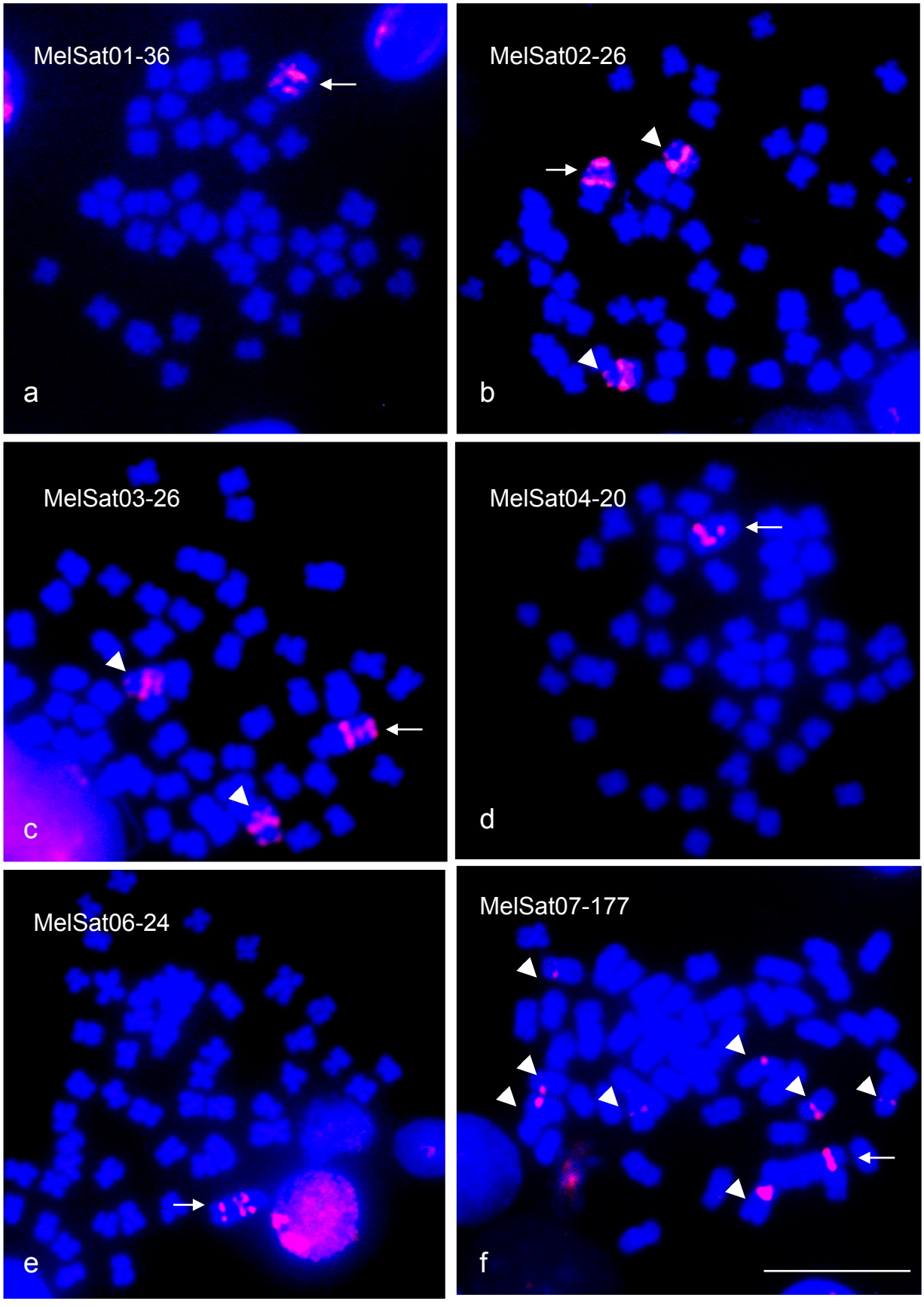
MelSat03-26        ------------------------------------------------------------

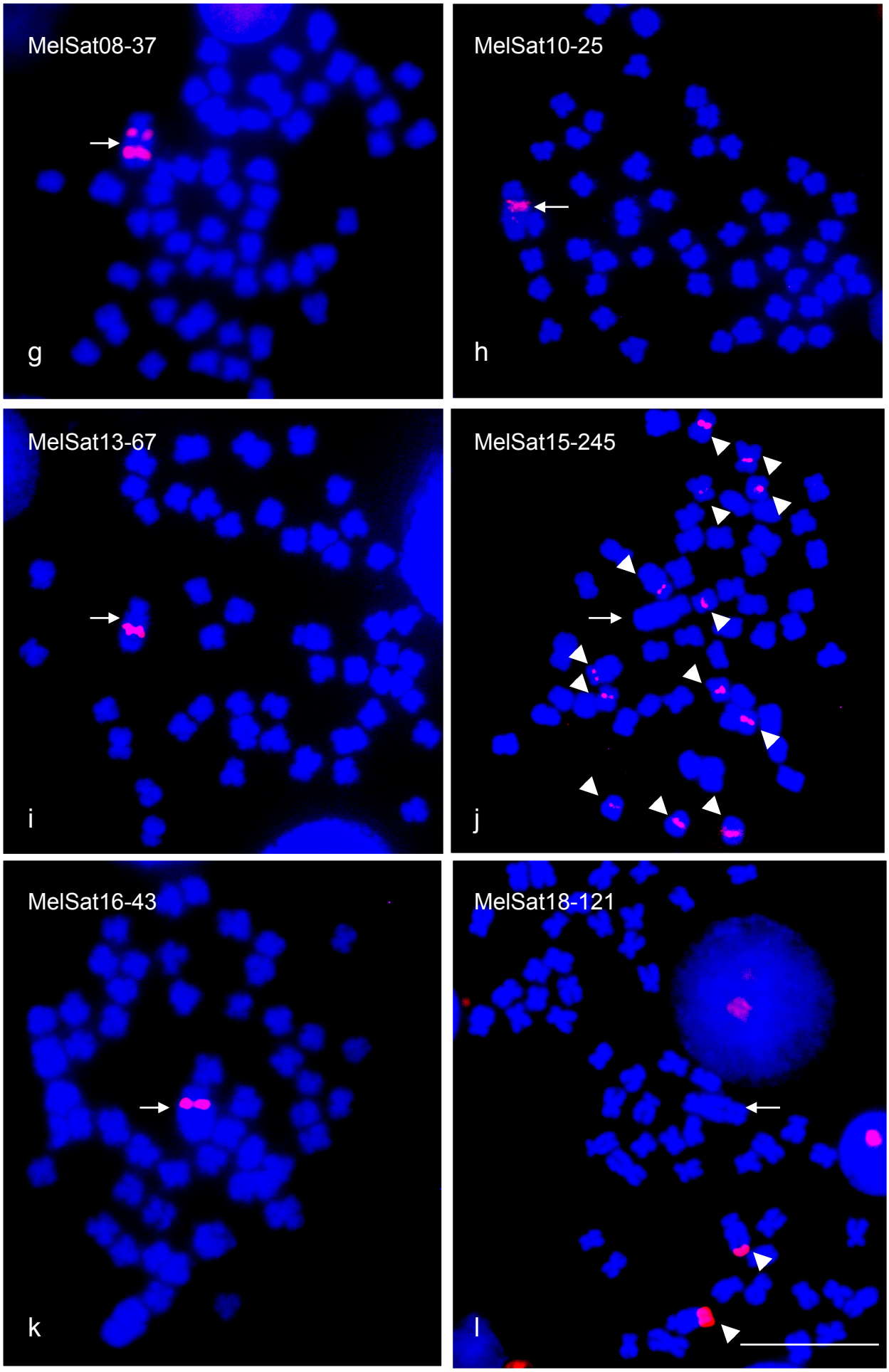
EF107661.1     541 CAGGGCCTTGCAAAGCTTTCCCCTANAAGTGGAGTCNGTATNAAAAAGCTTGGGCGTNAT 600

MelSat03-26        ----------------------

EF107661.1     601 TCATGGNNCCTAAGCTTGTTTNC 623
```

Figure 3


MelSat01-36
a
MelSat02-26
b
MelSat03-26
c
MelSat04-20
d
MelSat06-24
e
MelSat07-177
f


MelSat08-37
g
MelSat10-25
h
MelSat13-67
i
MelSat15-245
j
MelSat16-43
k
MelSat18-121
l

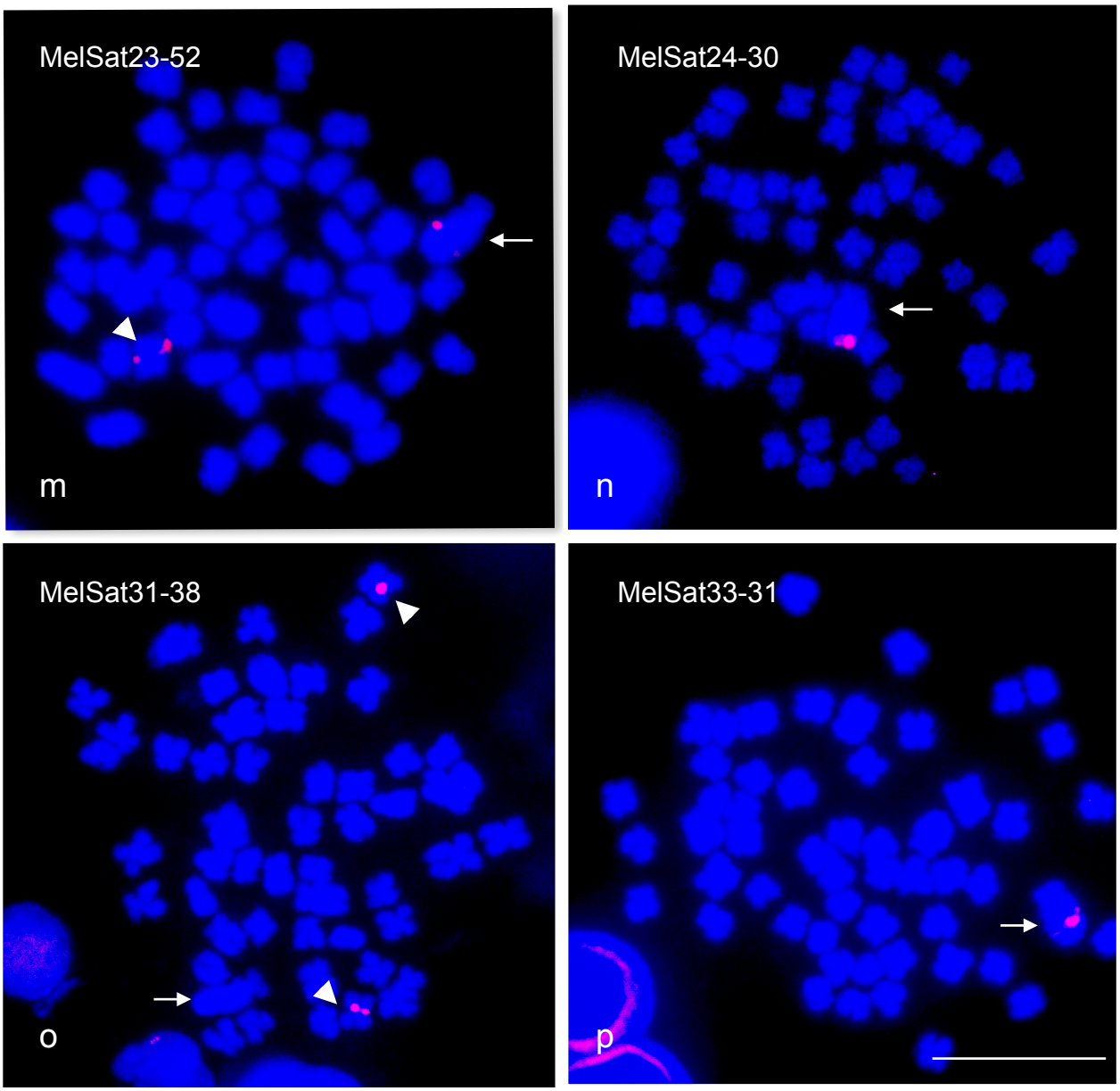

MelSat23-52
m
MelSat24-30
n
MelSat31-38
o
MelSat33-31
p

Figure 4

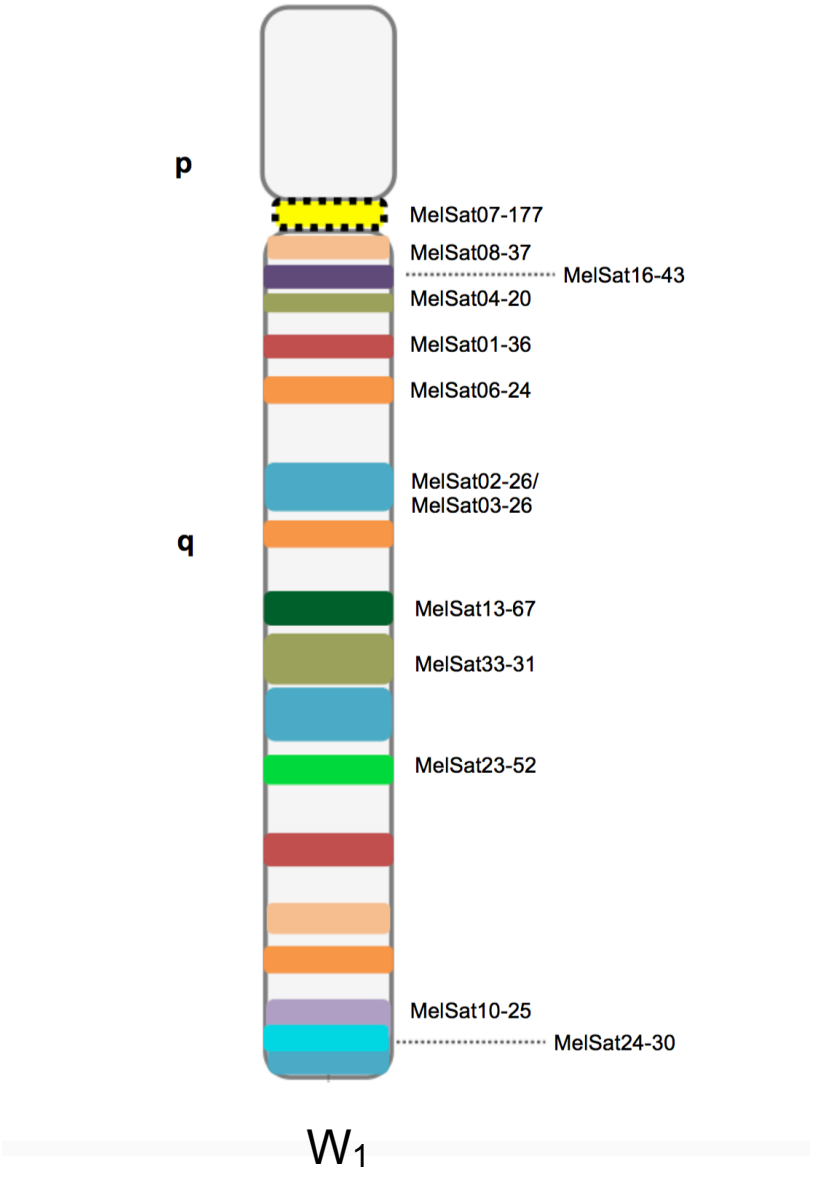
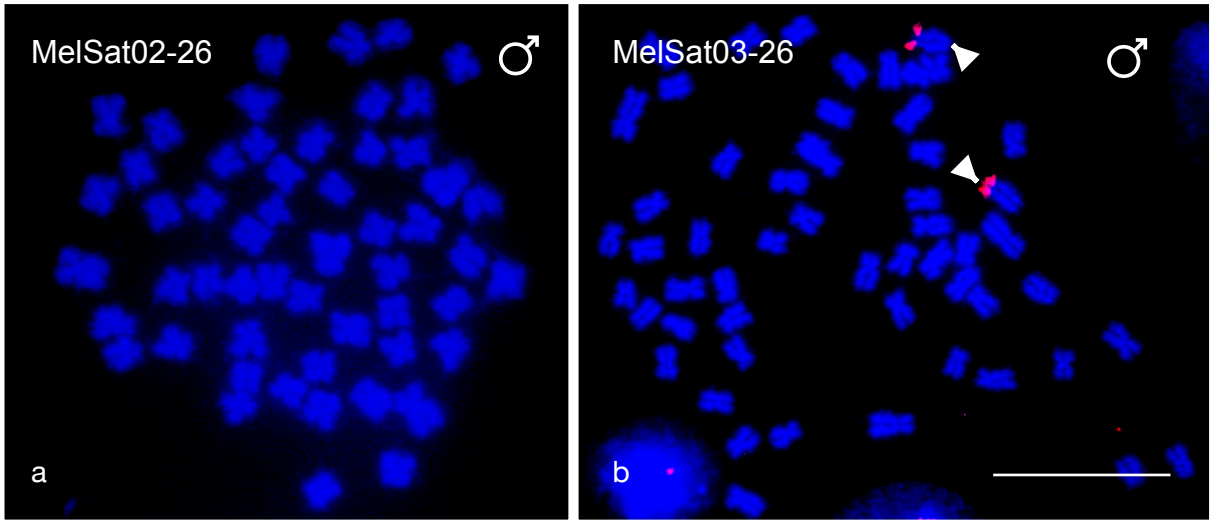

p
q
MelSat07-177
MelSat08-37
MelSat16-43
MelSat04-20
MelSat01-36
MelSat06-24
MelSat02-26/
MelSat03-26
MelSat13-67
MelSat33-31
MelSat23-52
MelSat10-25
MelSat24-30
W1

Figure 5



ARTIGO 2

Satellite DNA and sex chromosome evolution: insights regarding *Megaleporinus* (Anostomidae, Characiformes)

Carolina Crepaldi[1], Patricia Pasquali Parise Maltempi[1]

[1]Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brazil.

ABSTRACT

Species from the recently reclassified genus *Megaleporinus* share a ZZ/ZW sex chromosome system with a highly heterochromatic heteromorphic W chromosome. The genus poses as an interesting model for studies of evolution and selection of sex chromosomes in fish, as the highly repetitive composition of their W chromosomes might explain their recent acquirement when compared to close related species that lack differentiated sex chromosomes, such as *Leporinus*. Previously isolated satDNA variants were retrieved through high-throughput analysis of a *Megaleporinus elongatus'* female genome and were tested regarding physical mapping in the species' metaphases. The 16 most abundant variants that showed positive FISH signals in *M. elongatus* tested in both *Megaleporinus macrocephalus,* which also possesses a highly heterochromatic W chromosome, and *Leporinus friderici*, a species without heteromorphic sex chromosomes. PCR resulted in positive amplifications for both species extracted DNA, and physical mapping through FISH was carried out afterwards. From these variants, 8 were clustered in *M. macrocephalus* W chromosome, with various distributions and slight discrepancies in relation to *M. elongatus'* chromosomal localisation. We corroborated the degree of homology between their W chromosomes, sharing repetitive content involved in the genus sex chromosome and specific recombination-suppressed regions, but with clusterisation patterns for both copy number and chromosome localisation being different between the two species. This indicates the different accumulation processes happening to the same sequences in both heteromorphic chromosomes in posterior events after their origin, leading to divergences regarding the composition of the specific region of their heteromorphic sex chromosomes. The fact that *M. elongatus* is even on a different step of differentiation regarding its multiple sex chromosome system reiterates that. For *L. friderici*, the FISH signals for only two variants and overall absence of clustered satDNAs denotes the most relevant difference between the repetitive composition of both genus, and possibly the still ongoing process of heterochromatin accumulation on *L. friderici's* still non-differentiated sex chromosomes.

Introduction

In contrast with mammals and birds, that have well-known conserved sex chromosomes shared along the majority of their species, with male heterogamety and female heterogamety respectively, fish have a plethora of sex chromosome systems. The most frequent occurrence are homomorphic sex chromosomes, that often do not have a pronounced differentiation in comparison to their homologues (DE ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 2001; SCHARTL et al. 2016). Heteromorphic sex chromosomes, however, with either ZW, XY, both or in multiple systems, have been identified in different teleost families, and this lability is constantly being brought to attention (DE ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 2001; EZAZ et al. 2006; MANK & AVISE, 2009; SCHARTL et al. 2016).

Cichlids, sticklebacks, medaka, *Megaleporinus*, *Hoplias* and *Triportheus* are among some intensely studied fish with species that possess heteromorphic sex chromosomes, and are often analysed regarding their sex chromosomes composition, distribution and evolution (ROSS et al. 2009; TAKEHANA et al. 2007; GALETTI et al. 1995; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; KITANO et al. 2009; ROBERTS et al. 2009; YANO et al. 2017; DE OLIVEIRA et al. 2018).

This variable chromosomal structure, regarding sex chromosome differentiation, is usually attributed to heterochromatinization and repetitive DNA accumulation, following the event of recombination disruption among the recently sex-determining autosome and its homologue (PEICHEL et al. 2004; CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 2005; BERGERO et al. 2008).

Repetitive DNAs are highly dynamic genomic sequences, constituting large portions of eukaryotic genomes, and playing important roles in their structure, function and evolution (FLAVELL et al. 1974; JURKA et al. 2005; PLOHL et al. 2008, PLOHL et al. 2012). They have been associated with sex chromosome differentiation as a whole (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 2005, WRIGHT et al. 2016) and, therefore, mapping those associated with heteromorphic sex chromosomes in fish may be an useful tool for evolutionary analysis in this aspect (CHARLESWORTH

& CHARLESWORTH, 2005; EZAZ et al. 2013; EZAZ & DEAKIN, 2014; EZAZ et al. 2016).

The Anostomidae is one of the biggest Neotropical fish families, and has interestingly conserved karyotypic structure amongst its species. With diploid number 2n=54 and essentially metacentric and submetacentric chromosomes, a relatively old structure for it is expected (GALETTI et al. 1991). This group is particularly attractive regarding sex chromosomes analysis given the occurrence of ZZ/ZW system in few of its species, despite the conserved diploid number and overall conserved karyotype throughout the family.

The *Leporinus* recently revised by Ramirez et al. (2017), allocated species presenting heteromorphic sex chromosomes (ZZ/ZW system) *(Leporinus elongatus, L. muyscorum, L. obtusidens, L. brinco, L. conirostris, L. trifasciatus, L. macrocephalus, L. piavussu e L. reinhardti*), amongst other morphological features, into the new genus *Megaleporinus*. The remaining species, like *Leporinus friderici,* species studied in this paper, either lack distinguishable sex chromosomes or are cytogenetically unknown.

The ZW system in the *Megaleporinus* was proposed as a synapomorphy by Galetti et al. (1995), and the group's monophyly for extant species was supported by phylogenetic analysis (using COI, Cytb, RAG1, RAG2 and MYh6) (RAMIREZ et al. 2017). The W chromosomes in all *Megaleporinus* species are morphologically similar, always the biggest chromosomes out of their karyotypes, subtelocentric and highly heterochromatic q arm, as shown by C-banding analysis (GALETTI et al. 1995); their Z chromosome, on the other hand, has a similar size to the autosomal chromosomes (NAKAYAMA et al. 1994; GALETTI et al. 1995; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; HASHIMOTO et al. 2009). The *Megaleporinus* W chromosomes' enlargement is attributed to increase heterochromatinization, a feature also analysed in other ZW fish like some species of *Parodon* and *Semaprochilodus* (GALETTI JR. & FORESTI, 1986; FELDBERG et al. 1987; MOREIRA-FILHO et al. 1993).

The highly dynamic repetitive content and complexity level regarding the heteromorphic W chromosome is a feature shared among few Anostomidae species, and the *Megaleporinus* have had several W chromosome-associated sequences, physically mapped and compared between species (NAKAYAMA et al. 1994; KOEHLER et al. 1997; PARISE-MALTEMPI et al. 2007; PARISE-MALTEMPI et al. 2013; DE BORBA et al. 2013; POLTRONIERI et al. 2014; DE BARROS et al. 2018).

Parise-Maltempi et al. (2007) isolated the repetitive element Le*Spe*I from *M. elongatus,* a sequence that showed sex-specific patterns and helped indicate the probable multiple sex chromosome system ($Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$) for the species. The same Le*Spe*I probe was used in congeneric species *M. macrocephalus and M. obtusidens* (MARRETA et al. 2012) and although there similarities between the signals amongst the three analysed W chromosomes, there were still minor discrepancies. No additional bands in autosomal pairs for *M. macrocephalus* and *M. obtusidens* were observed*,* reiterating the possibility of another sex chromosomes differentiation step for *M. elongatus.* The Le*Spe*I sequence also lacked hybridisation on *Leporinus friderici* (which does not have a ZZ/ZW system), a fact that reinforced this repetitive DNA's specificity regarding differentiated sex chromosomes.

A microdissection study regarding three *Megaleporinus* species*, M. elongatus*, *M. macrocephalus* and *M. obtusidens,* and their respective W chromosomes was published by Parise-Maltempi et al. (2013). In this study, probes made from each W chromosome were hybridised through Cross-FISH with each species, and they evaluated the degree of homology between the heteromorphic sex chromosomes as a whole. Their results showed a certain degree of conserved composition amongst their W chromosome, reiterating the possible common origin and invasion of same repetitive sequences. The slight differences, however, might be attributed to different distribution of repetitive elements, as the WLe probe also hybridised in *M. macrocephalus* and *M. obtusidens* Z chromosomes, but not on *M. elongatus* one. The analysed species that do not possess differentiated sex chromosomes did not show hybridisation signals.

Another microdissecting study was performed by De Barros et al. (2018), by probing the W chromosome of *M. trifasciatus* and comparing with *M. macrocephalus* and *M. elongatus* sex chromosomes. The authors observed great similarity between the hybridisation signals between the W chromosomes of the three species, with the small differences being attributed to different repetitive elements being accumulated in different locations on each species.

Regardless of the possible common origin for this sex chromosome and similar chromosome morphology, distribution of the repetitive DNA content analysed so far already marks the differences between *Megaleporinus* species (PARISE-MALTEMPI et al. 2007, DA SILVA et al. 2012; DA SILVA et al. 2013; DE BORBA et al. 2013; DE BARROS et al. 2018). This reinforces the notion that sex chromosomes in this genus have probably evolved at distinct rates and acquired different repetitive composition. A more complete analysis regarding this heterochromatin content at molecular level might highlight even more differences between the species heteromorphic chromosomes, as well as help understand the repetitive DNA origin and evolution throughout the genus.

Despite sharing a common ancestor with other *Megaleporinus,* (RAMIREZ et al. 2017), *M. elongatus* might have even more distinguishable repetitive elements in its heteromorphic sex chromosome composition, which may play an important role in the stage of differentiation to multiple sex chromosomes. Indeed, repetitive sequences' role in sex chromosomes differentiation in the Anostomidae is crucial, but the evolutionary process leading to W sex chromosomes evolution, a trait shared amongst the *Megaleporinus* species, but at the same time with different compositions, remains unknown.

Therefore, here we used the most abundant satDNAs from the *M. elongatus* female genome isolated for the first time by Crepaldi & Parise-Maltempi (2019), in the first chapter of this thesis. We physically mapped this sequences in metaphases from *Megaleporinus macrocephalus*, a close-related species that has ZZ/ZW system, and *Leporinus friderici*, to analyse these sequences' occurrence in a species without differentiated sex chromosomes. The present work focused on a comparative

analysis between these species using fluorescence in situ hybridisation, hoping to understand the evolutionary dynamics of these repetitive sequences into the group's sex chromosome differentiation.

Materials and Methods

Chromosomal preparations and tissues from 3 female *Megaleporinus elongatus* were previously obtained from Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMbio) Pirassununga, São Paulo, Brazil. The material was kept refrigerated at -4°C at the animal cytogenetics laboratory in UNESP Rio Claro and authorised for manipulation by CEUA (protocol number 3524, approval code 09/2017). Also, chromosomal preparations and tissues from 3 female *Megaleporinus macrocephalus* and 2 female *Leporinus friderici* were used, previously obtained from Mato Grosso state, and authorised for manipulation in accordance with Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (19833-1) and Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (016/04 - CEEA).

Satellite DNA variants from *M. elongatus* female were previously isolated and physically mapped by the authors and were used in the present work for species comparison (Table 1, Crepaldi, 2019). The 16 satDNA variants that showed FISH signals on *M. elongatus* female were tested in the present work on *M. macrocephalus* and *L. friderici.*

Polymerase chain reactions (PCR) using these primers were carried out in order to validate the presence of these satDNA in *M. macrocephalus* and *Leporinus friderici.* Genomic DNA from both species was extracted from liver tissue using a genomic DNA purification kit by Wizard® (Promega). The extractions followed the protocol provided by the manufacturer, with the addition of a RNA removal step using RNAse (20mg/ml) (Roche®). The PCR conditions were carried out according to Crepaldi, 2019.

To generate fluorescence *in situ* hybridisation probes, amplified PCR products for each *M. elongatus* satDNA were labeled by nick translation including digoxigenin-11-dUTP (Roche®). For the FISH experiments, chromosomal preparations of mitotic chromosomes from *Megaleporinus elongatus, M. macrocephalus* and *Leporinus friderici* females were used, obtained from anterior kidney cell suspension of individuals according to Foresti et al. (1981).

The fluorescence *in situ* hybridisation analyses were performed according to Pinkel et al. (1986) protocol, with modifications by Cabral-de-Mello et al. (2010) and regarding denaturing time with 70% formamide (1m45sec at 72°C). Anti-digoxigenin-rhodamine (Roche®) was used for signal detection, and the chromosomes were counterstained with DAPI (4′,6-diamidino-2′-fenilindol) + Vectashield (Vector®). The slides were visualised via fluorescent microscopy with Olympus® BX51 and a digital camera attached (Olympus® DP71). Chromosome images were captured using DP Controller program and the merged images of both the metaphases and the signals were optimised using photo-editing *softwares* for optimised brightness and contrast and to caption each photo.

Results

As previously done by the authors, *M. elongatus* female genome had random *reads clusterised* by RepeatExplorer and 69 satDNA variants were isolated and manually annotated. From the isolated satDNA variants, the authors showed 16 successfully hybridised in the *M. elongatus* female's chromosomes, showing a *clustered* pattern in single or with multiple bands across the W chromosome and some autosomal pairs. These variants were among the most abundant in the analysed *reads* from the genome, and they were very well distributed across the heteromorphic sex chromosome and two of them, MelSat02-26 and MelSat03-26, also showed resemblance to the Le*Spe*I repetitive sequence and the supposed multiple sex chromosomes (PARISE-MALTEMPI et al. 2007).

These same 16 satDNA variants were verified through PCR in *M. macrocephalus* and *L. friderici* and also showed bands in agarose 1% gels,

confirming the amplification also in both of these species. From the probed PCRs products, only 9 showed conspicuous FISH signals in *M. macrocephalus* metaphases, and these were amongst the most abundant isolated from the *M. elongatus* analysed genome, also having hybridised in *M. elongatus* (Table 1). No satDNA variant was clustered exclusively in *M. macrocephalus.*

Apart from one (MelSat15-245), the other 8 satDNAs probed successfully in *M. macrocephalus* heteromorphic W chromosome (Figure 1). MelSat15-245 hybridised on more than one pair of autosomes in their centromeric position, such as in *M. elongatus* (Figure 1.8). Most of these were not exclusive to the W chromosome, with MelSat04-20, MelSat06-24, MelSat08-37 and MelSat10-25 also hybridising in autosome pairs (Figure 1.5, 1.6, 1.7). MelSat07-177, apparently a centromeric repetitive sequence, did not show hybridisation on any *M. macrocephalus* chromosomes.

Distribution across the W chromosome was varied, with most of them showing significant signal blocks on interstitial regions of the bigger arm. The signals showed resemblance to the *M. elongatus* ones, with slight differences regarding some of their positions (Figure 2).

Regarding *L. friderici*, although PCR amplifications generated positive bands for the analysed satDNA *primers*, there were no hybridisation signals on the species' metaphases, apart from just two variants (MelSat06-24 and MelSat07-177) (Figure 3) These were marked in a par of chromosomes, MelSat07-177 (Figure 3.2) in a similar manner with *M. elongatus*, possibly regarding a centromeric repetitive.

Discussion

Previously isolated satDNA variants from *M. elongatus* female in a concomitant work (CREPALDI, 2019, first chapter of this thesis) were tested in the present work, specifically those that showed conspicuous FISH signals in *M. elongatus.* From the 16 variants tested, 9 showed clusterised patterns in *M.*

macrocephalus and 2 in *L. friderici.* Overall, the isolated satDNA variants from *M. elongatus* are shared among these species, even with the one that does not possess sex chromosomes. Although present on the analysed genetic material, the satDNA variants have their distribution and clusterisation patterns variable among the three species, as confirmed by FISH.

Although also dispersed in several blocks across the W chromosome q arm, the variants' distribution in *M. macrocephalus* were relatively different when compared to *M. elongatus*, not showing *clusterised* patterns for some of the variants (Figure 2). Once again, although these chromosomes present apparent homology in the close-related species, intrageneric polymorphisms related to heterochromatinisation degree and repetitive sequences accumulation can be observed (MARCHAL et al. 2004; PEICHEL et al. 2004; CHARLESWORTH & CHARLESWORTH et al. 2005; EZAZ et al. 2009; KEJNOVSKY et al. 2009), and fish are remarkable examples of this. This variation have recently been analysed in few other Neotropical fish genus, like *Triportheus* (YANO et al. 2016, 2017), *Hoplias* (DE OLIVEIRA et al. 2018), *Ancistrus* (DE OLIVEIRA et al. 2008) and the Characidae family (UTSUNOMIA et al. 2017); as for *Astyanax* (DUÍLIO et al. 2017), although regarding the B chromosome occurrence in the genus, the same questions about probable common origin of the supernumerary chromosome for their species and subsequent repetitive elements accumulation, can also be applied.

A certain level of homology between the W chromosomes of *Megaleporinus* species have been demonstrated before, noting different hybridisation patterns for microdissected W chromosomes and specific sequences.

Parise-Maltempi et al. (2013) probed *M. elongatus* W chromosome and also hybridised it with *M. macrocephalus* and *M. obtusidens.* The authors demonstrated a common origin for these species' heteromorphic chromosomes, with high repetitive sequence content shared amongst them, although with particular divergences. However, the *M. elongatus* different sex chromosome evolutionary state may have also been noted by the authors, as the WLe probe, for the species W chromosome, did not hybridise in their own Z chromosome, showing FISH signals only for the other

two species' Z chromosomes. This was highlighted as a different repetitive accumulation pattern happening amongst this congeneric species' sex systems, despite their similarities regarding the heteromorphic chromosome occurrence and morphology.

Physical chromosome mapping of Le*Spe*I (PARISE-MALTEMPI et al. 2007) was carried out in *M. macrocephalus* and *M. obtusidens* females (MARRETA et al. 2012), and positive signals were only seen in these two species for their heteromorphic W chromosome, with three blocks in the long arm. The fact that MelSat02-26 and MelSat03-26, fragments of Le*Spe*I repetitive sequence, thought to be linked to *M. elongatus* multiple sex chromosomes system (PARISE-MALTEMPI et al. 2007), did not hybridise in *M. macrocephalus* autosomal pairs (Figure 1.2, 1.3) corroborate to Marreta et al. (2012) and Da Silva et al. (2013) physical mapping of Le*Spe*I in other *Megaleporinus* chromosomes. Once again, the absence of this sequence in *M. macrocephalus* karyotype apart in a clustering pattern apart from the W chromosome indicates its sex-related nature, but in a different system in *M. elongatus.*

De Barros et al. (2018) found a high degree of homology between W chromosomes from *Megaleporinus trifasciatus, M. macrocephalus* and *M. elongatus* using microdissection probes, suggesting the small differences between them to be regarded to different repetitive elements accumulation. In the present work, we evaluated *M. elongatus* and *M. macrocephalus* W chromosome comparison at a molecular level, pinpointing the sequences shared among these species starting from *M. elongatus* satellitome.

These previous works, however, demonstrate only a certain degree of shared composition among the species W chromosome with isolated cases of repetitive sequences or regarding the chromosomes as a whole, without a refined analysis of each sequence composing the heteromorphic chromosomes. In the present work, the comparison between *M. elongatus* and *M. macrocephalus* focused on their shared satDNA composition and even the sequences' *clusterisation* patterns in their karyotypes, in order to evaluate their differences at a more broad and detailed

molecular level. Our results corroborates the certain homology level already proposed for *Megaleporinus* species; however, we also showed the satDNA different clusterisation patterns for both copy number and chromosome localisation. We also highlighted the shared repetitive content and, although possibly sharing sex-determining genes but with each species heteromorphic chromosome having accumulating these elements differently in the recombination-suppressed region. The fact that these variants hybridised in some autosomal pairs of both *M. elongatus* and *M. macrocephalus*, especially their centromeric positions, notes the shared repetitive content regarding other chromosomal features as well, not only sex-related.

The *Megaleporinus* genus was recently confirmed as a monophyletic group by Ramirez et al. (2017), and the ZW system was proposed as a synapomorphy recently acquired, roughly 9.27Myr-12Myr ago, arising from an ancestor species (GALETTI et al. 1995, RAMIREZ et al. 2017). Despite the well-conserved karyotypic structure of Anostomidae in general (GALETTI et al. 1991), the sex chromosome acquisition by *Megaleporinus* was a relatively recent event, once again highlighting the “young” nature of fish sex chromosomes and their capability to rapidly acquire differentiated sex chromosomes. Alongside that, as different sex systems can occur in a same family or between congeneric species, the fact that *M. elongatus* poses an even different step of differentiation might indicate the genus rapid and diverse repetitive DNAs acquisition.

M. elongatus and *M. macrocephalus* diverged around 9.27Myr, just as all *Megaleporinus* species began to emerge. This could imply that the recent acquired sex system by a common ancestor was under different repetitive DNA accumulation patterns for each species. Therefore, the fact that these heteromorphic chromosomes share a collection of satellite DNAs scattered throughout their heterochromatin corroborates their common origin yet complex evolution for this chromosome in the genus. The initial step for chromosome differentiation for *Megaleporinus* took place with accumulation of highly heterochromatic segments in the sex chromosome, which then led to the emergence of similar repetitive sequences but organised in different patterns across the genus. The library hypothesis (FRY & SALSER, 1977; MEŠTROVIĆ et al. 1998) suggests that close-related species share common satDNA

coming from sequences of a common ancestor, but have suffered concerted evolution, each under different selective pressures and resulting in different repetitive amplification degrees in each species (MEŠTROVIĆ et al. 2006; PLOHL et al. 2012, RUIZ-RUANO et al. 2016). This was observed by the authors regarding the occurrence of the sequences in *M. macrocephalus* genetic material (as seen by PCR amplification) but with different FISH signals and clusterisation patterns when analysing the species' chromosomes in comparison to *M. elongatus.*

When analysed alongside *Leporinus friderici,* the satellite DNA content from *M. elongatus* shows an expected but interesting data. The lack of clusterised patterns in *L. friderici* for the analysed satDNA variants shows the lack of highly accumulated repetitive content in comparison to the close-related *Megaleporinus* genus. As noted by Marreta et al. (2012), no signals for Le*Spe*I were observed for *Leporinus friderici* chromosomes, and Parise-Maltempi et al. (2013) also noted that the microdissected heteromorphic W chromosome from *M. elongatus* did not hybridise in any of the species that lack sex chromosomes (such as *L. friderici).*

The absence of FISH signals, as seen in the present work with a more refined W chromosome repetitive content and physical mapping, remains true for *L. friderici*. However, the PCR amplification for the satDNA variants in the *L. friderici* DNA notes that they are not excluded from the species genetic material. Their presence is in a low copy number, not accumulated enough to be visible through FISH as easily recognisable as in the W heteromorphic chromosome for *M. elongatus* and *M. macrocephalus.* The shared repetitive content amplified in the three species might indicate the common emergence and invasion of these satellite DNA along the two genus, but the highly heterochromatic sex chromosome might have driven these sequences to duplicate even further, enlarging the chromosome and deeply clusterising along their genomes in comparison to *Leporinus.*

The fact that these sequences are present in *L. friderici* still on non-clusterised patterns might indicate the possibility of eventually duplicating and accumulating on the non-differentiated sex chromosome and triggering its heteromorphic characteristics, just as it happened with *Megaleporinus.* As seen by the present work,

alongside the fact the ZZ/ZW system in *Megaleporinus* have a very recent origin (RAMIREZ et al. 2017), and might just be under other differentiation processes as the multiple $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ system in *M. elongatus* (PARISE-MALTEMPI et al. 2007), the heterochromatin accumulation and repetitive sequences build-up might still be undergoing for *Leporinus,* and eventually a similar or even a new sex system might emerge for these species. Even if still posing non-differentiated sex chromosomes, the fact that the repetitive DNA accumulation process have taken a different turn for this genus is still evidence of the divergent and highly variable genome evolution of Neotropical fauna and fish in general.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. They also thank Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMbio) for providing individuals for chromosomic preparations.

References

BERGERO, R.; FORREST, A.; CHARLESWORTH, D. Active miniature transposons from a plant genome and its non-recombining Y chromosome. **Genetics**, 2008.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393-400, 2010.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B., MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.

DA SILVA, E. L.; DE BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

DA SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and Genome Organization of a Repetitive Element Associated with the Nucleolus Organizer Region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and genome research**, v. 139, n. 1, p. 22-28, 2013.

DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 91-100, 2001.

DE BARROS, L. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; FELDBERG, E. Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Sexual Development**, 2018.

DE BORBA, R. S,. DA SILVA, E. L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. **Mobile genetic elements,** *3*(6), e27460. 2013

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERD, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY 1 Y 2 and Z 1 Z 1 Z 2 Z 2/Z 1 Z 2 W 1 W 2) in catfishes of the genus Ancistrus (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, n. 2, p. 243, 2008.

DE OLIVEIRA, E. A.; SEMBER, A.; BERTOLLO, L. A. C.; YANO, C. F.; EZAZ, T.; MOREIRA-FILHO, O.; HATANAKA, T.; TRIFONOV, V.; LIEHR, T.; AL-RIKABI, A. B. H.; RÁB, P.; PAINS, H.; CIOFFI, M. B. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY_1Y_2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). **Chromosoma**, *127*(1), 115-128. 2018.

DUÍLIO, M. D. A.; UTSUNOMIA R.; RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, *7*(1), 12726. 2017.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 3, p. 157, 2011.

EZAZ, T.; STIGLEC, R.; VEYRUNES, F.; GRAVES, J. A. M. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. **Current Biology**, v. 16, n. 17, p. R736-R743, 2006.

EZAZ, T.; SARRE, S. D.; O`MEALLY, D.; MARSHALL-GRAVES, J. A.; GEORGES, A. Sex chromosome evolution in lizards: independent origins and rapid transitions. **Cytogenetic and genome research**, v. 127, n. 2-4, p. 249-260, 2009.

EZAZ, T.; AZAD, B.; O`MEALLY, D.; YOUNG, M. J.; MATSUBARA, K.; EDWARDS, M. J.; ZHANG, X.; HOLLELEY, C. E.; DEAKIN, J. E.; GRAVES, J. A. M.; GEORGES, A.; EDWARDS, S. V.; SARRE, S. D. Sequence and gene content of a large fragment of a lizard sex chromosome and evaluation of candidate sex differentiating gene R-spondin 1. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 899, 2013.

EZAZ, T.; DEAKIN, J. E. Repetitive sequence and sex chromosome evolution in vertebrates. **Advances in Evolutionary Biology**, v. 2014, 2014.

EZAZ, T.; SRIKULNATH, K.; GRAVES, J. A. M. Origin of amniote sex chromosomes: an ancestral super-sex chromosome, or common requirements?. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 1, p. 94-105, 2016.

FLAVELL, R. B.; BENNET, M. D.; SMITH, J. B., SMITH, D. B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical genetics**, v. 12, n. 4, p. 257-269, 1974.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, *31*(3), 137-144. 1981.

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS-α satellite DNA from kangaroo rat Dipodomys ordii and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, n. 4, p. 1069-1084, 1977.

GALETTI JR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, v. 44, n. 3-4, p. 287-292, 1991.

GALETTI JR, P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A Monophyletic ZW Sex Chromosome System in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, n. 4, p. 375-382, 1995.

HASHIMOTO, D.T.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 124, n. 2, p. 151-157, 2009.

KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 533, 2009.

KITANO, J.; ROSS, J. A.; MORI, S.; KUME, M.; JONES, F. C.; CHAN, Y. F.; ABSHER, D. M.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; MYERS, R. M.; KINGSLEY, D. M.; PEICHEL, C. L. A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1079, 2009.

KOEHLER, M. R.; HAAF, T.; GUTTENBACH, M.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. **Chromosome Research**, v. 5, n. 5, p. 325-331, 1997.

MANK, J. E.; AVISE, J. C. Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. **Sexual Development**, v. 3, n. 2-3, p. 60-67, 2009.

MARCHAL, J. A.; ACOSTA, M. J.; NIETZEL, H.; SPERLING, K.; BULLEJOS, M.; DÍAS DE LA GUARDA, R.; SÁNCHEZ, A. X chromosome painting in *Microtus*: origin

and evolution of the giant sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 12, n. 8, p. 767-776, 2004.

MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE−MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of fish biology**, v. 80, n. 3, p. 630-637, 2012.

MEŠTROVIĆ, N.; PLOHL, M.; MRAVINAC, B., URGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus Palorus--experimental evidence for the" library" hypothesis. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 8, p. 1062-1068, 1998.

MEŠTROVIĆ, N.; CASTAGNONE-SERENO, P.; PLOHL, M. Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root-knot nematodes. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 12, p. 2316-2325, 2006.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr, P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia,** *46*(2-3), 115-125. 1993.

NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, n. 1, p. 31-39, 1994.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 1, p.1-2, 2013.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; SILVA, E. L.; RENS, W.; DEARDEN, F; O´BRIEN, P. C. M.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M. A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.: 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**, 116:218–223, 2007.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; DA SILVA, E. L.; RENS, W.; DEARDEN, F.; O`BRIEN, P. C. M.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M. A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 60, 2013.

PEICHEL, C.L.; ROSS, J.A.; MATSON, C.K.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; MYERS, R. M.; MORI, S.; SCHLUTER, D.; KINGSLEY, D. M. (2004). The master sex determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. **Current biology**, v. 14, n. 16, p. 1416-1424, 2004.

PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1, p. 72-82, 2008.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers, p. 126-152, 2012.

POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L. A. C.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 142, n. 1, p. 40-45, 2014.

PUCCI, M. B.; NOGAROTO, V.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. The karyotypes and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in the genus Characidium (Characiformes, Crenuchidae). **Comparative cytogenetics**, v. 12, n. 3, p. 421, 2018.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.O.; GALETTI JR, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 308-323, 2017.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DARIO, F. Di.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

ROBERTS, R. B.; SER, J.R.; KOCHER, T. D. Sexual conflict resolved by invasion of a novel sex determiner in Lake Malawi cichlid fishes. **Science**, v. 326, n. 5955, p. 998-1001, 2009.

ROSS, J. A.; URTON, J. R.; BOLAND, J.; SHAPIRO, M. D.; PEICHEL, C. L. Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). **PLoS Genetics**, v. 5, n. 2, p. e1000391, 2009.

RUIZ-RUANO, F.J., LÓPEZ-LEÓN, M.D., CABRERO, J. and CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, p. 28333, 2016.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.

TAKEHANA, Y.; DEMIYAH, D.; NARUSE, K.; HAMAGUCHI, S.; SAZAIZUMI, M. Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1335-1340, 2007.

UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; SILVA, D. M. Z. A.; SERRANO, E. A.; ROSA, I. F.; SCUDELER, P. E. S.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. A glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 103, 2017.

WRIGHT, A. E.; DEAN, R.; ZIMMER, F.; MARK, J. E. How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, p. 12087, 2016.

YANO C. F.; BERTOLLO, L. A. C., LIEHR T.; TROY, W. P.,; CIOFFI, M. D. B. W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triportheidae): an ongoing process narrated by repetitive sequences. **Journal of Heredity**, *107*(4), 342-348. 2016.

YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; EZAZ, T. TRIFONOV, V.; SEMBER, A. LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae). **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 276, 2017.

Table 1 - Chromosome localisation of *clustered* satDNA in female metaphases of *M. elongatus, M. macrocephalus* and *L. friderici*. Hyphen indicates the absence of FISH signals. C: centromeric position; D: distal; I: interstitial; T: telomeric.

SatDNA	Chromosome localisation *M. elongatus*		Chromosome localisation *M. macrocephalus*		Chromosome localisation *L. friderici*
	Sex chr (W1)	Autosomes	Sex chr (W)	Autosomes	
MelSat01-36	I	-	I	-	-
MelSat02-26	I, T	D, I (1 pair)	I, T	-	-
MelSat03-26	I, T	D, I (1 pair)	I, T	-	-
MelSat04-20	C, I	-	I	I (1 pair)	-
MelSat06-24	I	-	I	C (3 pairs)	T (1 pair)
MelSat07-177	C	C (4 pairs)	-	-	C (1 pair)
MelSat08-37	I	-	I	I (1 chromosome)	-
MelSat10-25	T	-	I	C (2 pairs)	-
MelSat13-67	I	-	-	-	-
MelSat15-245	-	C (7 pairs)	-	C (3 pairs)	-
MelSat16-43	C	-	C	-	-
MelSat18-121	-	T (1 pair)	-	-	-
MelSat23-52	I	I (1 chromosome)	-	-	-
MelSat24-30	T	-	-	-	-
MelSat31-38	-	C (1 pair)	-	-	-
MelSat33-31	I	-	-	-	-

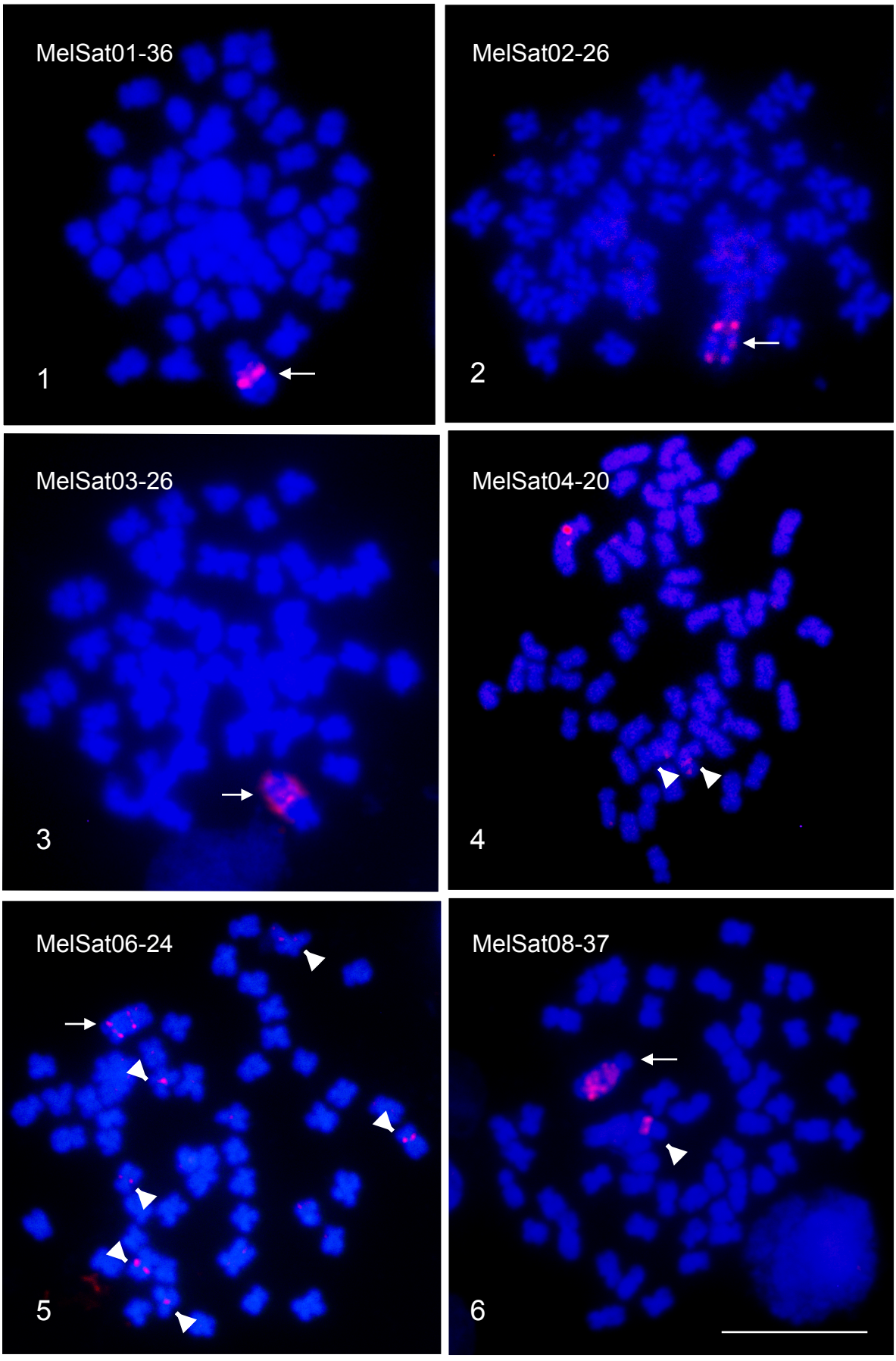
Figure Legends

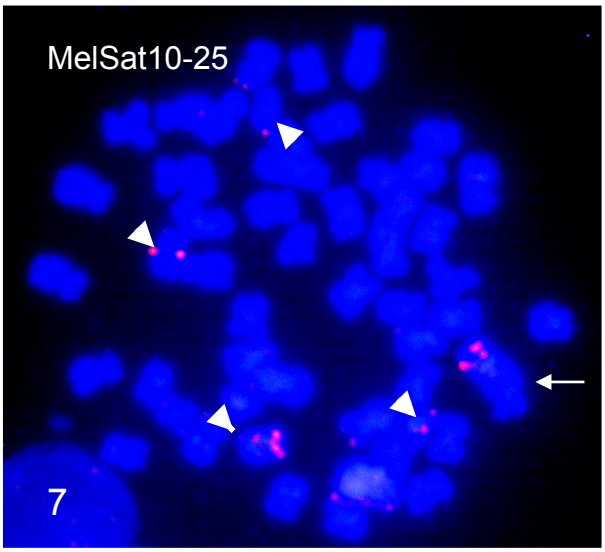
Figure 1. Chromosome mapping of *clustered* isolated satDNAs in mitotic metaphases of *Megaleporinus macrocephalus* female specimens (1-9). Arrow indicates the heteromorphic sex chromosome, and arrowheads indicate FISH signals on autosomal pairs. Bar = 10μm.

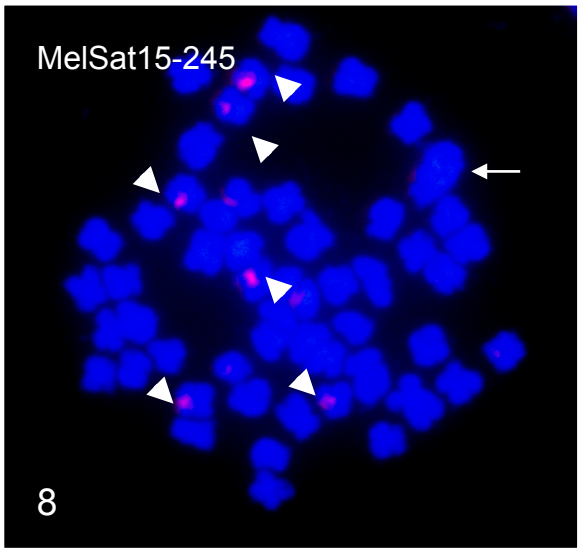
Figure 2. Comparison between heteromorphic W chromosomes from *M. elongatus* (top) and *M. macrocephalus* (bottom), with the *clusterised* satDNA variants from *M. elongatus. M. macrocephalus* W chromosome without clusterisation are detailed (*).

Figure 3: Chromosome mapping of *clustered* isolated satDNAs in mitotic metaphases of *Leporinus friderici* female specimens (1, 2). Arrowheads indicate FISH signals. Bar = 10μm

Figure 1


MelSat01-36
1
MelSat02-26
2
MelSat03-26
3
MelSat04-20
4
MelSat06-24
5
MelSat08-37
6


MelSat10-25
7


MelSat15-245
8

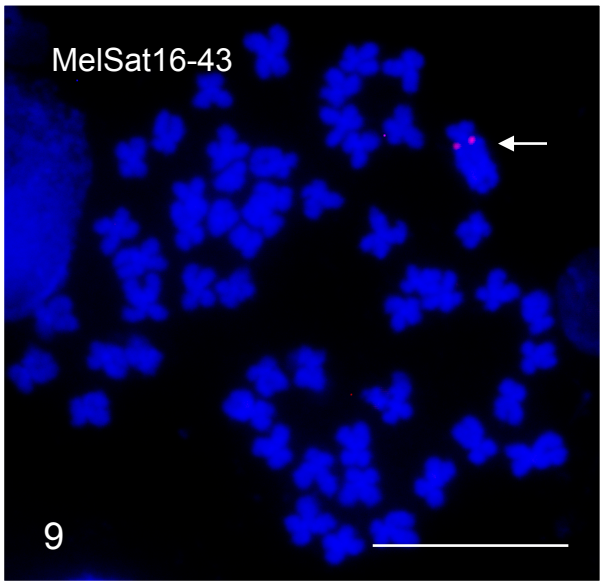
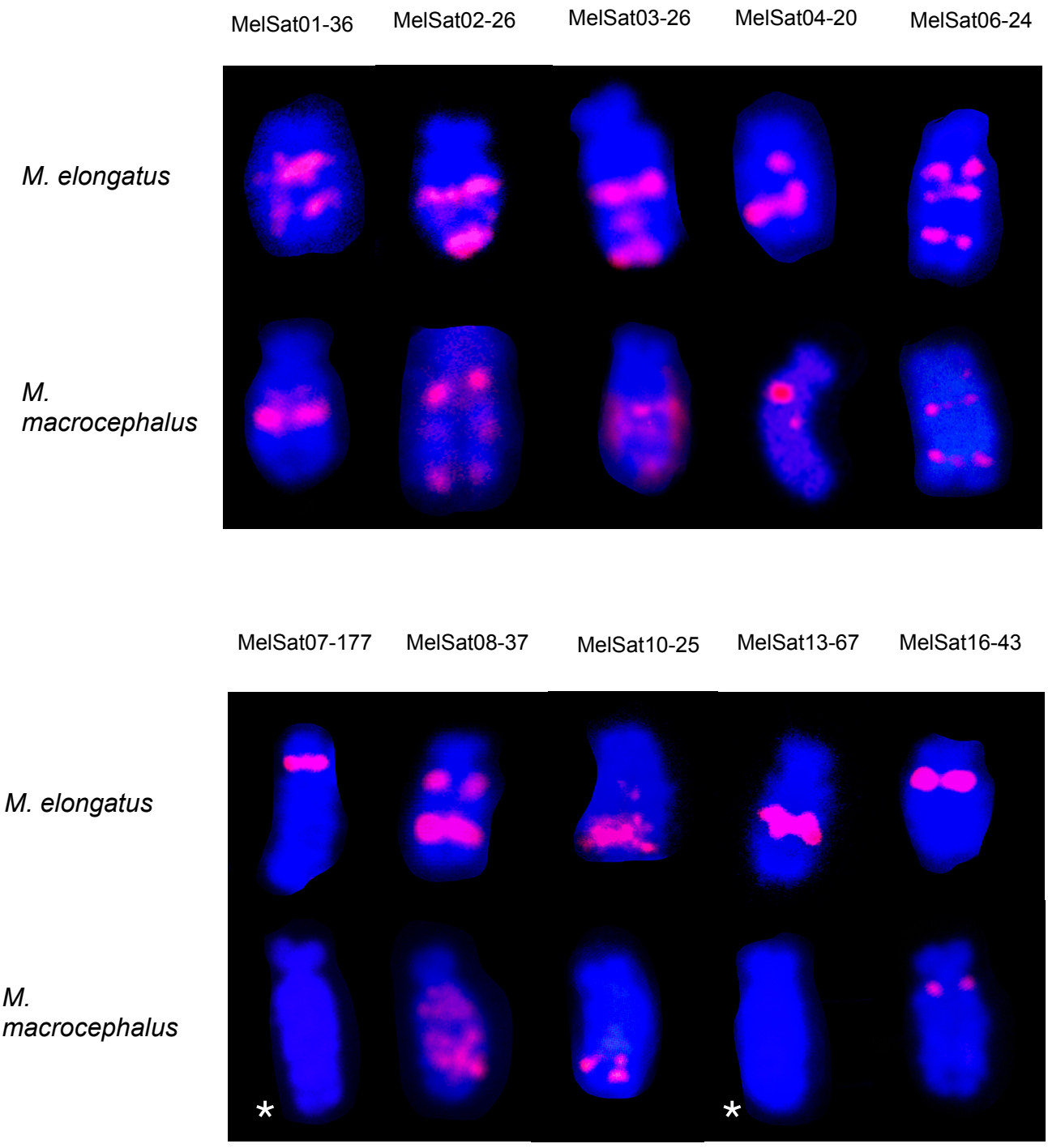

MelSat16-43
9

Figure 2


MelSat01-36
MelSat02-26
MelSat03-26
MelSat04-20
MelSat06-24
M. elongatus
M. macrocephalus
MelSat07-177
MelSat08-37
MelSat10-25
MelSat13-67
MelSat16-43
M. elongatus
M. macrocephalus
*
*

MelSat23-52 MelSat24-3 MelSat33-3

M. elongatus

M. macrocephalus

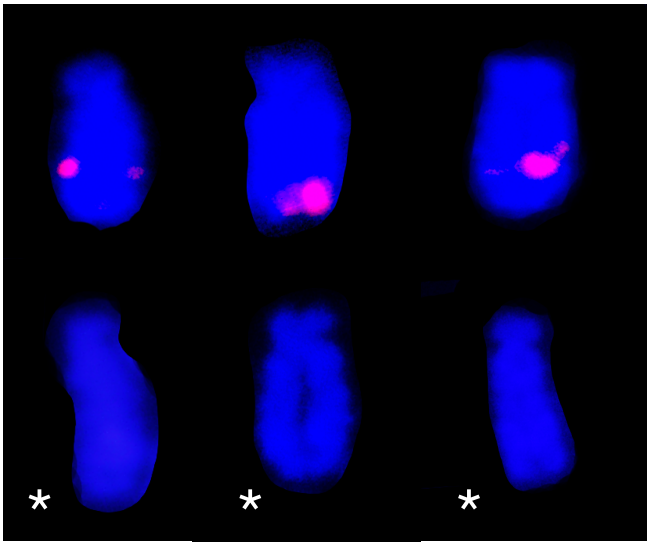
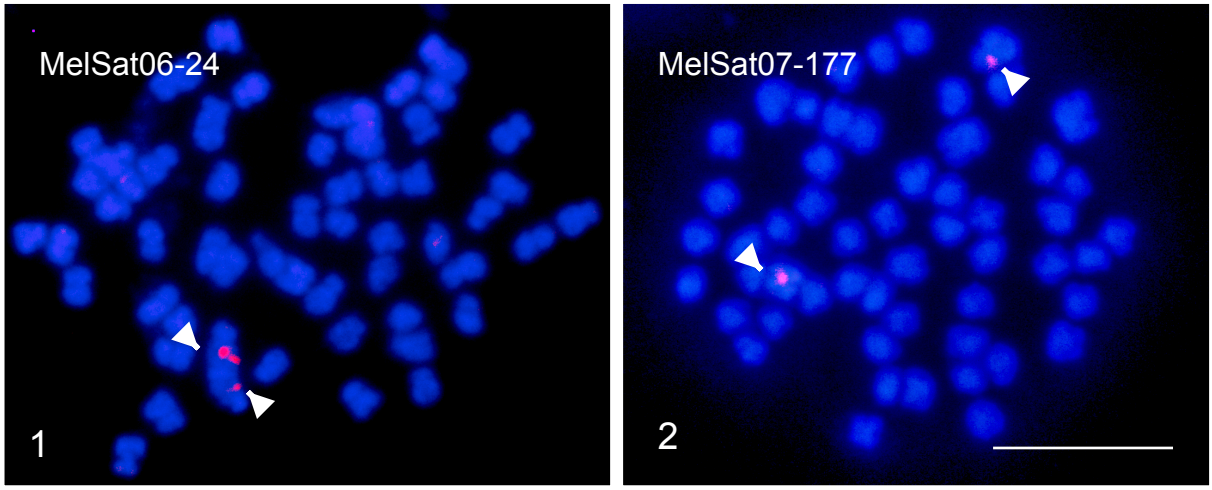


Figure 3



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estudo mais refinado de DNAs satélites do genoma da fêmea de *Megaleporinus elongatus* trouxe informações interessantes sobre a composição repetitiva do cromossomo heteromórfico W da espécie. Marcações específicas foram identificadas no cromossomo sexual da espécie, denotando o grande acúmulo destas sequências nas regiões heterocromáticas deste cromossomo.

- Dois variantes de satDNA, MelSat02-26 e MelSat03-26 mostraram padrões de hibridação semelhantes ao elemento repetitivo Le*Spe*I, e foram confirmados como sendo partes da sequência deste. Le*Spe*I é tido como um importante fator de identificação para o provável sistema múltiplo ocorrendo em *M. elongatus*, se mostra um dos DNAs satélites mais abundantes no genoma da fêmea. Os dois satDNAs pertencentes à sua sequência são dois dos mais abundantes isolados no genoma da fêmea; assim, a alta incidência destes variantes, e consequentemente de Le*Spe*I, no genoma da fêmea e alta *clusterização* nos cromossomos pode demonstrar a influência sobre o acúmulo repetitivo no cariótipo e a diferenciação em cromossomos sexuais múltiplos.

- A hibridação destes DNAs satélites em *M. macrocephalus* demonstrou o grau de compartilhamento de sequências entre esta espécie e *M. elongatus* especialmente no que concerne ao cromossomo heteromórfico. Enfatizamos que o grau de *clusterisação* e organização destas sequências nos genomas de ambas as espécies parece ser um fator importante para os diferentes cromossomos sexuais recentemente adquiridos no sistema ZZ/ZW do gênero. O fato de *Leporinus friderici* também ter sido investigada e demonstrado quase nenhum acúmulo das sequências em seus cromossomos, porém terem sido amplificadas em seu material genético, evidencia a importância do acúmulo destas sequências na diferenciação do sistema sexual do grupo.

- Apesar do cariótipo conservado da família Anostomidae, os DNAs satélites isolados e mapeados neste trabalho demonstram que estes elementos tiveram

papel relevante na diversificação do cariótipo do grupo, especialmente no que diz respeito ao aparecimento e diferenciação de cromossomos heteromórficos.

6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. S.;FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. The X 1 X 2 Y sex chromosome system in the fish Hoplias malabaricus. I. G-, C-and chromosome replication banding. **Chromosome research**, *5*(7), 493-499. 1997.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521-524, 2006.

BULL, J.J. et al. **Evolution of sex determining mechanisms**. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., 1983.

BURNS, M. D.; FRABLE, B. W.; SIDLAUSKAS, B.L. A New Species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae), from the Orinoco Basin, Venezuela. **Copeia**, v. 2014, n. 2, p. 206-214, 2014.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393-400, 2010.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish Harttia carvalhoi (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, *112*(3-4), 320-324. 2006.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B., MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.

CHARLESWORTH, D.; MANK, J. E. The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. **Genetics**, v. 186, n. 1, p. 9-31, 2010.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers, p. 197-221, 2012.

CRUZ, V. P.; SHIMABUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1X2Y in *Potamotrygon aff. motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 201-208, 2011.

DA SILVA, E. L.; DE BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

DA SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and Genome Organization of a Repetitive Element Associated with the Nucleolus

Organizer Region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and genome research**, v. 139, n. 1, p. 22-28, 2013.

DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 91-100, 2001.

DE BARROS, L. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; FELDBERG, E. Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Sexual Development**, 2018.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3, p. 191-364, 2002.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 3, p. 157, 2011.

EZAZ, T.; STIGLEC, R.; VEYRUNES, F.; GRAVES, J. A. M. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. **Current Biology**, v. 16, n. 17, p. R736-R743, 2006.

EZAZ, T.; AZAD, B.; O`MEALLY, D.; YOUNG, M. J.; MATSUBARA, K.; EDWARDS, M. J.; ZHANG, X.; HOLLELEY, C. E.; DEAKIN, J. E.; GRAVES, J. A. M.; GEORGES, A.; EDWARDS, S. V.; SARRE, S. D. Sequence and gene content of a large fragment of a lizard sex chromosome and evaluation of candidate sex differentiating gene R-spondin 1. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 899, 2013.

EZAZ, T.; DEAKIN, J. E. Repetitive sequence and sex chromosome evolution in vertebrates. **Advances in Evolutionary Biology**, v. 2014, 2014.

EZAZ, T.; SRIKULNATH, K.; GRAVES, J. A. M. Origin of amniote sex chromosomes: an ancestral super-sex chromosome, or common requirements?. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 1, p. 94-105, 2016.

FERREIRA, I. A.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C.; GALETTI JR., P. M.; MARTINS, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Genetica**, v. 129, n. 3, p. 253-257, 2007.

FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 411-418, 2008.

FLAVELL, R. B.; BENNET, M. D.; SMITH, J. B., SMITH, D. B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical genetics**, v. 12, n. 4, p. 257-269, 1974.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, *31*(3), 137-144. 1981.

FROESE, R.; PAULY, D. "**FishBase. World Wide Web electronic publication**." 2018. Disponível em: www.fishbase.org. Acesso em: 06/2018

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 29, n. 3, p. 138-142, 1981.

GALETTI JR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, v. 44, n. 3-4, p. 287-292, 1991.

GALETTI JR, P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A Monophyletic ZW Sex Chromosome System in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, n. 4, p. 375-382, 1995.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and genome research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

GARCÍA, G.; RÍOS, N.; GUTIÉRREZ, V. Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Genetica**, v. 143, n. 3, p. 353-360, 2015.

GAZONI, T.; HADDAD, C. F. B.; NARIMATSU, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LYRA, M. L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 269-278, 2018.

GORDON, A.; HANNON, G. J. Fastx-toolkit. **FASTQ/A short-reads pre-processing tools**. 2010. Disponível em: <http://hannonlab. cshl. edu/fastx_toolkit> Acesso em: 6 de Janeiro de 2018.

GRAVES, J. A. M. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 565-586, 2008.

GRAVES, J. A. M.; PEICHEL, C. L. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options?. **Genome biology**, v. 11, n. 4, p. 205, 2010.

GRUTZNER, F.; RENS, W.; TSEND-AYUSH, E.; EL-MOGHARBEL, N.; O'BRIEN, P. C.; JONES, R. C.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GRAVES J. A. M. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. **Nature**, *432* (7019), 913. 2004.

GRUETZNER, F.; ASHLEY, T.; ROWELL, D. M.; GRAVES, J. A. M. How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. **Chromosoma**, v. 115, n. 2, p. 75-88, 2006.

HASHIMOTO, D.T.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 124, n. 2, p. 151-157, 2009.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: insights from the medaka fish (*Oryzias latipes*). **Molecular and cellular endocrinology**, v. 306, n. 1, p. 51-58, 2009.

JAGANNATHAN, M.; YAMASHITA, Y. M. Function of junk: pericentromeric satellite DNA in chromosome maintenance. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 319-328. 2017.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHUENG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B;, MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12), 1647-1649. 2012.

KOEHLER, M. R.; HAAF, T.; GUTTENBACH, M.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. **Chromosome Research**, v. 5, n. 5, p. 325-331, 1997.

KONDO, M.; NANDA, I.; HORNUNG, U.; SCHMID, M.; SCHARTL, M. Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. **Current Biology**, v. 14, n. 18, p. 1664-1669, 2004.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 8.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution,** v. 33 p. 1870-1874. 2015.

LORITE, P.; MUNOZ-LÓPEZ, M.; CARRILLO, J. A.; SANLLORENTE, O.; VELA, J.; MORA, P.; TINAUT, A.; TORRES, M. I.; PALOMEQUE, T. Concerted evolution, a slow process for ant satellite DNA: study of the satellite DNA in the *Aphaenogaster* genus (Hymenoptera, Formicidae). **Organisms Diversity & Evolution**, v. 17, n. 3, p. 595-606, 2017.

MANK, J. E.; AVISE, J. C. Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. **Sexual Development**, v. 3, n. 2-3, p. 60-67, 2009.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE−MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae)

using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of fish biology**, v. 80, n. 3, p. 630-637, 2012.

MEHROTRA, S.; GOEL, S.; RAINA, S. N.; RAJPAL, V. R. Significance of satellite DNA revealed by conservation of a widespread repeat DNA sequence among angiosperms. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 7, p. 1790-1801, 2014.

MESTRINER, C. A.; GALETTI JR., P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. 1, p. 1, 2000.

MOLINA, W. F.; GALETTI, P. M. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). **Genetica**, v. 130, n. 2, p. 153-160, 2007.

NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, n. 1, p. 31-39, 1994.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 378, 2010.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 1, p.1-2, 2013.

NOWAK, R. Mining treasures from 'junk DNA'. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 608-610, 1994

OGATA, M.; HASEGAWA, Y.; OHTANI, H.; MINEYAMA, M., MIURA, I. The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog *Rana rugosa*. **Heredity**, v. 100, p. 92–99. 2008.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CASTILLO, E. R.; MARTÍ, D. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC evolutionary biology**, *13*(1), 167. 2013.

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564, 2008.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.: 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**, 116:218–223, 2007.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; SILVA, E. L.; RENS, W.; DEARDEN, F; O´BRIEN, P. C. M.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M. A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

PEICHEL, C.L.; ROSS, J.A.; MATSON, C.K.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; MYERS, R. M.; MORI, S.; SCHLUTER, D.; KINGSLEY, D. M. (2004). The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. **Current biology**, v. 14, n. 16, p. 1416-1424, 2004.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1, p. 72-82, 2008.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers, p. 126-152, 2012.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, n. 4, p. 313-325, 2014.

POLETTO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L. A. C.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 142, n. 1, p. 40-45, 2014.

QUESADA DEL BOSQUE, M. E.; LÓPEZ-FLORES, I.; SUÁREZ-SANTIAGO, V. N.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Differential spreading of Hin fI satellite DNA variants during radiation in Centaureinae. **Annals of botany**, v. 112, n. 9, p. 1793-1802, 2013.

RAMIREZ, J. L.; CARVALHO-COSTA, L. F.; VENERE, P. C.; CARVALHO, D. C.; TROY, W. P.; GALETTI JR, P. M. Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. **Journal of fish biology**, v. 88, n. 3, p. 1204-1214, 2016.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.O.; GALETTI JR, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 308-323, 2017.

RUIZ-RUANO, F.J., LÓPEZ-LEÓN, M.D., CABRERO, J. and CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, p. 28333, 2016.

RUIZ-RUANO, F.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 4, p. 487-500, 2017.

RUIZ-RUANO, F; CASTILLO-MARTINEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEON, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, p. 1-18, 2018.

SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, n. 2, p. 157, 2007.

SHAPIRO, J. A.; VON STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 227-250, 2005.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SCHARTL, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. **Current opinion in genetics & development**, v. 14, n. 6, p. 634-641, 2004.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.

SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology**. Nature Methods**, v. 5, p. 16-18, 2008.

UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; SILVA, D. M. Z. A.; SERRANO, E. A.; ROSA, I. F.; SCUDELER, P. E. S.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. A glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 103, 2017.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETTO, A. B.; FANTINATTI, B. E. A.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 133, n. 1, p. 34-42, 2010.

VALENTIM, F. C. S.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C., GROSS, M. C.; FELDBERG, E. XX/XO, a rare sex chromosome system in Potamotrygon freshwater stingray from the Amazon Basin, Brazil. **Genetica**, *141*(7-9), 381-387. 2013.

VENERE, P. C.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C.; GALETTI, P. M. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**, v. 121, n. 1, p. 75-80, 2004.

VICARI, M. R.; NORAGOTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

WHITE, M. J. D. **Os cromossomos**. Ed. Nacional, 1977.

WRIGHT, A. E.; DEAN, R.; ZIMMER, F.; MARK, J. E. How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, p. 12087, 2016.

YANO C. F.; BERTOLLO, L. A. C., LIEHR T.; TROY, W. P.,; CIOFFI, M. D. B. W chromosome dynamics in Triportheus species (Characiformes, Triportheidae): an ongoing process narrated by repetitive sequences. **Journal of Heredity**, *107*(4), 342-348. 2016.

YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; EZAZ, T. TRIFONOV, V.; SEMBER, A. LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae). **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 276, 2017.