

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IRAINÉ DUARTE DE SOUZA

CITOGENÉTICA COMPARATIVA DO GÊNERO *PIPA* (ANURA, PIPIDAE) E ESTUDO DO
DNA SATELITE PCP190 NO GENOMA DE ANUROS

CURITIBA

2020

IRAINÉ DUARTE DE SOUZA

CITOGENÉTICA COMPARATIVA DO GÊNERO *PIPA* (ANURA, PIPIDAE) E ESTUDO DO
DNA SATELITE PCP190 NO GENOMA DE ANUROS

Dissertação apresentada ao curso de Pós- Graduação
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi
Co-orientador: Prof. Dr. Stenio Eder Vittorazzi

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Souza, Iraíne Duarte de.

Citogenética comparativa do gênero *Pipa* (Anura, Pipidae) e estudo do DNA satélite PCP 190 nos genomas de anuros. / Iraíne Duarte de Souza. – Curitiba, 2020.
68 f. : il.

Orientador: Daniel Pacheco Bruschi.

Coorientador: Stenio Eder Vittorazzi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Anuros. 2. Anfíbio. 3. Citogenética animal. 4. Genomas. I. Título. II. Bruschi, Daniel Pacheco. III. Vittorazzi, Stenio Eder. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 591.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016005P1

ATA Nº324

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM GENÉTICA**

No dia trinta e um de março de dois mil e vinte às 09:00 horas, na sala Anfiteatro 01, Departamento de Genética, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **IRAINÉ DUARTE DE SOUZA**, intitulada: **Citogenética comparativa do gênero *Pipa* (Anura, Pipidae) e estudo do DNA satélite PCP 190 nos genomas de anuros**, sob orientação do Prof. Dr. **DANIEL PACHECO BRUSCHI**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **DANIEL PACHECO BRUSCHI** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **RAFAEL BUENO NOLETO** (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ), **IRIS HASS** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **DANIEL PACHECO BRUSCHI**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 10:39:59.0

DANIEL PACHECO BRUSCHI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 20:50:33.0

RAFAEL BUENO NOLETO

Avallador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 11:18:06.0

IRIS HASS

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 39195

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 39195



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de IRINE DUARTE DE SOUZA intitulada: *Citogenética comparativa do gênero Pipa (Anura, Pipidae) e estudo do DNA satélite PCP 190 nos genomas de anuros*, sob orientação do Prof. Dr. DANIEL PACHECO BRUSCHI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 10:39:59.0

DANIEL PACHECO BRUSCHI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 20:50:33.0

RAFAEL BUENO NOLETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 11:18:06.0

IRIS HASS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo Siga-UFPR, com a seguinte identificação única: 39195

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.ppgg.ufpr.br/siga/validar/autenticacaoassinatura.jsp>
e insira o código 39195

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao departamento de Genética por fornecer todo o suporte neces para a conclusão deste trabalho.

A CAPES pelo investimento e suporte financeiro. Sem isto, não se desenvolve ciência neste pais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi e ao meu co-orientador, Dr. Stenio Eder Vittorazzi, por todo direcionamento e ensinamento que me foi passado durante o mestrado. Obrigada pela paciência e dedicação.

A todo o grupo do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese ambiental pela companhia, troca de conhecimentos e ajuda em experimentos. Obrigada por tudo.

Ao Johnny, por todo o apoio que você me deu. Obrigada.

Aos meus amigos que fiz na UFMA, que estão em São Luis ou espalhados por este Brasil imenso. Apesar da saudade e da distância sempre estarão comigo, (Em especial os grupos “estudo bíblico e “bioconcurseiros”). Obrigada pessoal.

As minhas amigas/irmãs que fiz na Casa da estudante de Curitiba (CEUC) que se tornaram minha família aqui em Curitiba. Amo vocês.

A minha família que sempre me apoiou e que mais me faz falta em todos os momentos. Amo vocês acima de qualquer coisa.

E por último, obrigada para a pessoa mais importante da minha vida, mãe, obrigada por tudo!! Eu sei de todos os seus sacrifícios que a senhora fez por mim, a senhora sempre será minha base. Te amo.

Dedico este trabalho à todas as mulheres cientistas, em especial as mulheres negras, por abrirem caminhos para todas nós e mostrar que nós podemos ocupar estes espaços. Todo o meu respeito, gratidão e admiração.

Mariele Vive!

Dedico também a todos nós cientistas que insistimos nesta carreira pouco valorizada, com muito amor e força de vontade. É necessário exaltarnos neste momento onde a educação sofre um desmonte no nosso país.

Nós resistimos!

Nós somos necessários!

Nós fazemos a diferença!

A vida não é fácil para nenhum de nós.
Temos que ter persistência e, acima de tudo,
confiança em nós mesmos.

Marie Curie

Onde quer que haja mulheres e homens,
há sempre o que fazer, há
sempre o que ensinar, há sempre o
que aprender.

Paulo Freire

RESUMO

O gênero *Pipa* é exclusivamente neotropical e atualmente agrupa sete espécies. A ausência de uma filogenia robusta é uma das grandes lacunas para os estudos evolutivos no gênero. Métodos clássicos da citogenética fornecem dados kariotípicos, além disso, DNAs repetitivos tem se mostrado promissores em estudos relacionados à evolução cromossômica. Dentre os satDNA isolados em anfíbios, o PcP190 se destaca por estar distribuído em diferentes espécies de anuros. Considerando que, apenas algumas espécies de *Pipa* foram kariotipadas, justifica-se o uso de técnicas de citogenética no estudo da evolução kariotípica do grupo. Além disso, a busca da sequência satDNA PcP190 utilizando bioinformática é uma ótima ferramenta para identificar essas sequências nos genomas disponíveis. Para a descrição kariotípica, foram utilizados métodos de coloração convencional, bandamento C e detecção da RON. Para detecção das sequências microssatélites em *P. pipa*, sete sondas de microssatélites e repetições teloméricas foram utilizadas no método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Foi redescrito o kariótipo de *P. parva* com $2n=30$, todos com morfologia telocêntrica e com blocos de heterocromatina localizados nas regiões centroméricas dos cromossomos, a RON foi detectada na região subterminal do par 2. Foi descrito pela primeira vez o kariótipo de *P. arrabali* com $2n=20$ cromossomos. *Pipa arrabali* e *P. carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019), compartilham mesmo número cromossômico e morfologia dos pares, sendo diferenciados pela posição da RON, localizada na região pericentromérica do 9q em *P. arrabali* e em *P. carvalhoi* na região subterminal desse mesmo braço, o que pode ter sido resultado de uma inversão paracêntrica. O mapeamento das repetições em *P. pipa* revelou sinais na região centromérica dos primeiros quatro pares dos cromossomos do kariótipo. A organização de algumas classes de DNAs repetitivos em *P. pipa* indica o potencial desse marcador no estudo da evolução cromossômica do gênero. Quanto ao mapeamento do satDNA PcP190 nos genomas dos anuros já sequenciados, foram utilizados dados de *Sequence Read Archive* (SRAS) e selecionadas sequências do PcP190 disponíveis na literatura. A região mais conservada foi utilizada como *query* nas buscas. 24 espécies de anuros foram mapeadas e para avaliar a distribuição do PcP190, reconstruímos um cladograma entre as espécies com genomas amostrados e espécies relatadas com esta sequência. Reportamos a presença de cópias de PcP190 em duas espécies da família Hylidae, e pela primeira vez, nas famílias Bufonidae e Dendrobatidae. Inferimos que estas sequências surgiram por duplicação em um ancestral comum e a manutenção tem sido baseada em *Concerted evolution* e *birth-and death*. Uma região de 122 pb de PcP190 de diferentes espécies apresentou alta similaridade, hipotetizamos que isto pode ser devido a uma alta pressão seletiva, resultante de uma possível função genômica desta região. A variação do número de *reads* mapeados pode ser devido ao fato de espécies filogeneticamente relacionadas compartilharem uma biblioteca de DNAs repetitivos, onde a expansão de satDNA ocorre de maneira independente após seu processo de divergência. Nossos dados fornecem um modelo para verificar a presença de diferentes sequências nos genomas.

Palavras-chave: *Pipa*, sequências repetitivas, citogenética, pipeline , PcP190

ABSTRACT

The genus *Pipa* is exclusively neotropical and currently groups seven species. The absence of a robust phylogeny is one of the major gaps for evolutionary studies in the genre. Classic methods of cytogenetics provide karyotypic data, in addition, repetitive DNA has shown promise in studies related to chromosomal evolution. Among the satDNA isolated from amphibians, PcP190 stands out for being distributed in different anuran species. Considering that only some species of *Pipa* were karyotyped, the use of cytogenetic techniques in the study of the group's karyotype evolution is justified. In addition, the search for the PDP190 satDNA sequence using bioinformatics is a great tool to identify these sequences in the available genomes. For the karyotype description, conventional staining, C banding and NOR detection methods were used. To detect microsatellite sequences in *P. pipa*, seven microsatellite probes and telomeric repetitions were used in the fluorescent in situ hybridization (FISH) method. The *P. parva* karyotype was redescribed with $2n = 30$, all with telocentric morphology and with heterochromatin blocks located in the centromeric regions of the chromosomes, NOR was detected in the subterminal region of pair 2. The *P. arrabali* karyotype was described for the first time, with $2n = 20$ chromosomes. *P. arrabali* and *P. carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019), share the same chromosomal number and morphology of the pairs, being differentiated by the position of NOR, located in the 9q pericentromeric region in *P. arrabali* and in *P. carvalhoi* in the subterminal region of that same arm, which may have been the result of a paracentric inversion. The mapping of the repeats in *P. pipa* revealed signs in the centromeric region of the first four pairs of the karyotype chromosomes. The organization of some classes of repetitive DNA in *P. pipa*, indicates the potential of this marker in the study of the chromosomal evolution of the genus. As for the mapping of the satDNA PcP190 in the genomes of the anurans already sequenced, data from the Sequence Read Archive (SRAS) were used and PcP190 sequences were available in the literature. The most conserved region was used as a query in searches. 24 anuran species were mapped and to assess the distribution of PcP190, we reconstructed a cladogram between species with sampled genomes and species reported with this sequence. We report the presence of copies of PcP190 in two species of the family Hylidae, and for the first time, in the families Bufonidae and Dendrobatidae. We infer that these sequences appeared by duplication in a common ancestor and the maintenance has been based on Concerted evolution and birth-and death. A 122 bp region of PcP190 from different species showed high similarity, we hypothesize that this may be due to a high selective pressure, resulting from a possible genomic function of this region. The variation in the number of reads mapped may be due to the fact that phylogenetically related species share a library of repetitive DNAs, where the expansion of satDNA occurs independently after its divergence process. Our data provide a model to verify the presence of different sequences in the genomes.

Keywords: *Pipa*, repetitive sequences, cytogenetics, PcP190

LISTA DE FÍGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1- Cladograma de relações filogenéticas entre as espécies do gênero <i>Pipa</i> , baseados em caracteres morfológicos, os caracteres que ocorrem nos nós, estão listados no trabalho de Trueb & Cannattela (1986)	15
--	----

CAPÍTULO I

FIGURA 1- Cariótipos de <i>Pipa parva</i> . (A) Cromossomos metafásicos submetidos à coloração convencional com Giemsa, em destaque, o par cromossômico portador das NOR. (B) Bandamento C e (C) coloração com DAPI sequencial ao bandamento C	27
--	----

FIGURA 2- Cromossomos metafásicos de <i>Pipa pipa</i> submetidos à coloração convencional com Giemsa e, no destaque, o par cromossômico portador da RON.	28
---	----

FIGURA 3- Cromossomos metafásicos submetidos ao método de FISH com sonda de repetição telomérica (TTAGGG) _n	28
--	----

FIGURA 4- Cromossomos metafásicos submetidos ao método de FISH com sondas de repetições microssatélites (GATA) ₈ , a seta no par 3 indica um sinal intersticial (A); (CA) ₁₅ (B); (CAG) ₁₀ a seta no par 6 indica um sinal intersticial (C); e (GA) ₁₅ (D)	29
--	----

FIGURA 5- Cromossomos metafásicos de <i>Pipa arrabali</i> submetidos à coloração convencional com Giemsa e detecção das NORs pelo método de Impregnação pela Prata (Ag-NOR) (A). Em destaque, par cromossômico portador das RON.....	30
--	----

CAPÍTULO II

FIGURA 1- Representação esquemática da <i>pipeline</i> desenvolvido para as buscas genômicas implementadas no presente estudo	45
---	----

FIGURA 2- Reconstrução das relações filogenéticas entre as espécies avaliadas quanto a presença/ausência de cópias do satDNA PcP190. As espécies que contem o símbolo ☒ tiveram <i>reads</i> mapeados pela primeira vez neste trabalho, as que contêm um * já foram isoladas cópias desse elemento em seus genomas. As espécies que possuem o símbolo ☐ não tiveram <i>reads</i> mapeados em nossos experimentos.....	48
--	----

FIGURA 3- Sequências de satDNA PcP190 alinhadas no programa Geneious 8.0 (Biomatters) e utilizadas como <i>query</i> para a busca de <i>reads</i> nos genomas de anuros	49
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1- Listagem das espécies amostradas, família e respectivo número de acesso dos dados de *Sequence Read Archive* (SRAs) incluídos em nosso estudo42

TABELA 2- Sequências do satDNA PcP190 isolada de diferentes espécies de anuros e depositadas no GenBank utilizadas nos experimentos de mapeamento de *reads* e seus respectivos números de acesso 43

TABELA 3- Espécies que tiveram o satDNA PcP190 mapeados e as sequências isoladas de *Crossodactylus gaudichaudii* , *Pseudis tocantins*, *Lysapsus limellum* e *Leptodactylus latrans* disponibilizadas no GenBank..... 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. GÊNERO <i>PIPA</i>	14
2.2. CITOGENÉTICA COMPARATIVA	16
2.3. O USO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS	16
2.3.1. DNA SATÉLITE PCP190	18
2.4. A BUSCA DE NOVOS MARCADORES NA “ERA GENÔMICA”	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO I	23
RESUMO	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II	38
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO GERAL.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
4. CONCLUSÕES FINAIS	57
5. REFERÊNCIAS.....	59

1- INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Pipa* (Pipidae) é um grupo monofilético constituído por sete espécies (Frost, 2020). A ausência de uma filogenia robusta para avaliar os relacionamentos intragenéricos em *Pipa* é uma das grandes lacunas para os estudos evolutivos no gênero. Métodos clássicos da citogenética fornecem dados na discriminação inicial dos cariótipos. Os estudos citogenéticos no gênero *Pipa* se iniciaram com a descrição do número cromossômico de *P. pipa* Wikbom (1950), permanecendo décadas seguintes restritos a novas contagens cromossômicas e descrições cariotípicas simples em *P. parva*. (Morescalchi, 1968; Morescalchi, 1970).

Recentemente, o trabalho de Zattera *et al.*, 2019, apresentou importantes dados cariotípicos de *P. carvalhoi*, como o número diplóide $2n=20$, assim como a composição da heterocromatina e a identificação da região organizadora de nucléolo (RON). Além disso, no trabalho de Zattera *et al.* (2020, submetido) foi utilizado sequências repetitivas microssatélites- (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈, (CGC)₁₀, (GAA)₁₀, (CAG)₁₀ e (GACA)₄ -como marcadores, adicionando importantes informações para o estudo do gênero.

Com o desenvolvimento da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e sua utilização como técnica para mapear sequências repetitivas no cariótipo, o FISH tem se mostrado uma ferramenta bastante promissora em estudos relacionados à evolução cromossômica (Schmid & Steinlein; Liu *et al.*, 2017; Ferro *et al.*, 2018).

Estão incluídos na classe de sequências repetitivas, famílias multigênicas, minissatélites, microssatélites, e os DNAs satélites (satDNA), estas sequências se encontram de maneira significativa no genoma dos organismos e podem ser organizadas *in tandem* ou dispersas no genoma (Garrido-Ramos, 2016, Garrido-Ramos, 2017), porém, sua localização e distribuição precisam ser melhor compreendidas em grande parte dos organismos (Ruiz-Ruano *et al.*, 2015).

Nos anfíbios, o genoma é em grande parte constituído por sequências repetitivas (Liedke *et al.*, 2018), entretanto, esta fração repetitiva de DNA vem sendo ainda pouco estudada, com poucas destas sequências caracterizadas em detalhes até o momento. Uma destas sequências é o DNA satélite PcP190, uma sequência de 190 pb isolada da espécie *Physalemus curvieri* (leptodactylidae) (Vittorazzi *et al.*, 2011), e pode ser um bom candidato para estudos *in silico*, pois está presente em diferentes grupos de anuros (Vittorazzi *et al.*, 2011, 2014, 2016; Gatto *et al.*, 2016, 2018; Targueta *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020), o que indica que estas sequências repetitivas podem estar distribuídas em diferentes grupos, exercendo alguma função.

Considerando que, apenas algumas espécies do gênero *Pipa* foram até o momento cariotipadas, justifica-se o uso de técnicas de citogenética clássica e moleculares no estudo da evolução cariotípica

do gênero. Além disso, a busca da sequência satDNA PcP190 utilizando bioinformática, é uma ótima ferramenta para identificar e caracterizar estas sequências, além de fornecer um modelo para verificar a presença de diferentes sequências nos genomas disponíveis.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Pipa*

Os anfíbios atuais ainda são os únicos vertebrados vivos que apresentam transição de fases de vida entre os ambientes aquático e terrestre (Hickman *et al.*, 2004). Neste grupo são encontradas três linhagens distintas, a ordem Caudata com 9 famílias, Gymnophiona com 10 famílias e a terceira linhagem, a ordem Anura, a mais diversa em número de espécies, com 54 famílias reconhecidas (Frost, 2020).

Dentro dos anuros, a família Pipidae constitui um grupo de anfíbios que apresentam características próprias: é a única família exclusivamente aquática, diferenciando-se de outras por possuir adaptações morfológicas associadas ao modo de vida aquático, como a retenção de linha lateral no adulto e membranas interdigitais. Os espécimes são caracterizados por apresentarem um corpo achatado dorsal-ventralmente e os membros traseiros adaptados à natação (Cannatella & Trueb 1988; Trueb & Mansserein, 2000).

O trabalho de Irissari *et al.*, (2011) fornece um forte suporte ao monofiletismo da família Pipidae. Os representantes dessa família são encontrados na África e na América, compreendendo quatro gêneros: *Pipa* (Laurenti, 1768) com 7 espécies, *Hymenochirus* (Boulenger, 1896) com quatro espécies, *Pseudhymenochirus* (Chabanaud, 1920) com uma espécie e *Xenopus* (Wagler, 1827) com 29 espécies (Frost, 2020). Alguns autores ainda dividem o gênero *Xenopus* em dois, utilizando como critério a análise filogenética e o número diploide ancestral, reconhecendo as espécies portadoras $2n=20$ e seus múltiplos, sob a denominação *Silurana* enquanto espécies derivadas de um ancestral de $2n=18$, e seus múltiplos, sob o a denominação *Xenopus*.

A família Pipidae tem sido frequentemente citada como evidência de uma conexão passada entre América do Sul e a África. Esta hipótese é baseada em um evento vicariante decorrente da separação dos continentes africano e americano (Trueb *et al.*, 2005), em que o ancestral para o gênero *Pipa* foi difundido pela América do Sul, enquanto os demais representantes permaneceram no continente africano (*Hymenochirus*, *Pseudhymenochirus* e *Xenopus*) (Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988).

O gênero *Pipa* é o único gênero da família presente no continente americano (Cannatella & Trueb, 1988). Este grupo atualmente possui sete espécies (Frost, 2019): *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937), *Pipa arrabali* (Izecksohn, 1976), *Pipa aspera* (Muller, 1924), *Pipa myersi* (Trueb, 1984), *Pipa parva* (Ruthven & Gaige, 1923), *Pipa pipa* (Linnaeus, 1758) e *Pipa snethlageae* (Muller, 1914) (Trueb & Canatella, 1986 – Figura 1). Dentre algumas características que diferenciam esse gênero dos demais pipídeos, podemos citar sua reprodução, em que os ovos/larvas são carregados nas costas da fêmea durante o desenvolvimento (Trueb & Cannatella, 1986; Canedo, 2006). As espécies do gênero são distribuídas desde o Panamá, nordeste da Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana, Suriname até o Brasil (Trueb & Canatella, 1986; Frost 2020).

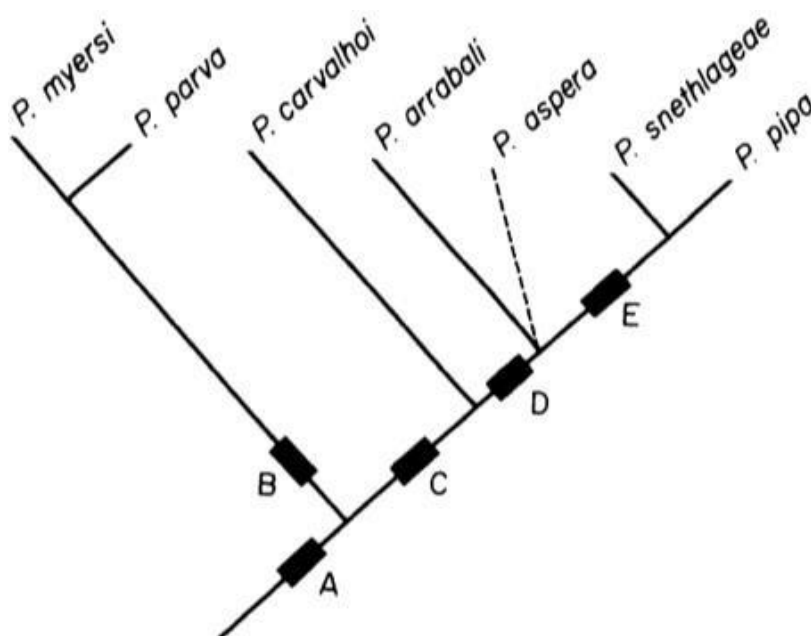


Figura 1. Cladograma das relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Pipa* baseado em caracteres morfológicos. Figura extraída de Trueb & Cannatella (1986).

As espécies do gênero também podem ser divididas em dois grandes grupos, considerando caracteres morfológicos, sendo um denominado “macropipas” e constituído pelas espécies *P. pipa* e *P. snethlageae*, e o segundo denominado de “micropipas”, formado por todas as demais espécies do gênero (Trueb & Massemin, 2000). Essa nomenclatura é genérica, porém, é reportada por diferentes autores e será utilizada aqui neste trabalho. Considerando apenas essa abordagem morfológica, o relacionamento entre as espécies incluídas no grupo das micropipas ainda não estão bem resolvidas (Trueb & Canatella, 1986; Trueb & Massemin, 2000).

2.2. Citogenética comparativa

Métodos clássicos de análise fornecem dados para a discriminação inicial dos cariótipos (Sobti *et al.*, 2002; Green & Sessions, 2012). Dentre estes, podemos citar a coloração convencional, que fornece informações relevantes para se determinar o número cromossômico e inferir o número fundamental (NF) do cariótipo analisado de acordo com o número de braços cromossômicos, além de identificar o tamanho e morfologia cromossômica dos cariótipos, sendo possível classificar os cromossomos em metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos ou telocêntricos, gerando informações para diferenciação de espécies (Green & Sessions, 2007; 2012).

Já o bandeamento C auxilia na identificação de regiões de heterocromatina constitutiva. Entendemos como heterocromatina constitutiva aquelas regiões de cromatina que permanecem condensadas em todas as células do organismo, enriquecida por sequências de DNAs repetitivos e reduzida atividade gênica (Green & Sessions, 2012). A análise do padrão de distribuição dos blocos de heterocromatina em um cariótipo pode ser empregada na detecção e caracterização de alterações cromossômicas estruturais, como deleções, inversões e translocações (Hizumi *et al.*, 1989, Gill *et al.*, 1991).

A região organizadora de nucléolo (RON) é constituída de sequências de DNA dispostas *in tandem*, que codificam para os RNAs ribossomais 5S, 5.8S, 18S e 28S (Schwarzacher & Wachtler, 1983). A RON tem grande importância no estudo da evolução dos cromossomos, pois suas posições nos cromossomos são relativamente conservadas em grupos de espécies relacionadas, tornando-a um importante marcador cromossômico (Pikaard, 2000). A localização das RONS nos cariótipos pode ser um dado importante para a compreensão das relações filogenéticas em diversos grupos (Nguyen *et al.*, 2008; Britton-Davidian *et al.*, 2012; Tate *et al.*, 2015).

O estudo dos anuros tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos, principalmente após a incorporação de novas técnicas, como o uso da metodologia de análise filogenética utilizando citogenética comparativa (De Mattos *et al.*, 2014; Soares de Oliveira *et al.*, 2016). A citogenética comparativa tem contribuído de maneira significativa para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cromossômica em Anura (Gruber *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2013; Ferro *et al.*, 2018) e também na descrição de novas espécies (Cuevas, 2008; Siqueira *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2009), ampliando nossos conhecimentos sobre a biodiversidade em anuros (Baldissera *et al.*, 1993; Busin *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2008).

Um exemplo de uma análise citogenética comparativa sendo utilizada para inferir a evolução cromossômica de um grupo é o trabalho de Mezzasalma *et al.*, (2015). Nesse trabalho os autores

sugerem hipóteses para a evolução cromossômica na família Pipidae. Esses autores mapearam os dados cromossômicos das espécies, nas árvores filogenéticas propostas por Irisarri *et al.*, (2011) e Pyron & Wiens (2011), e utilizaram como grupo externo a espécie *Rhinophrynus dorsalis*, família monotípica Rhinophrynidae e portadora de um cariótipo de $2n=22$. Assim, uma das hipóteses para contar a história evolutiva de Pipidae seria que, o número $2n=22$ teria sido rearranjado por meio de inversões e fusão cromossômica, resultando no cariótipo $2n=20$, que constitui o número diplóide primitivo dos pipídeos, condição observada nas espécies *Hymenochirus boettgeri* (Mezzasalma *et al.*, 2015), *Pseudhymenochirus merlini* (Chibanaud, 1920; Mezzasalma *et al.*, 2015), *Xenopus tropicalis* (Gray, 1984) e em *P. carvalhoi* (Pfeuffer- Friederich, 1980; Zattera *et al.*, 2019).

Dentro do gênero *Pipa*, *P. pipa* com $2n=22$ (Wickbom 1950) e *P. parva* com $2n=30$ (Morescalchi, 1968), apresentam cariótipos bastante peculiares e diferentes dos demais pipídeos. Porém, a descrição cariotípica dessas espécies carece de maiores informações, o que torna difícil a construção de hipóteses robustas sobre a evolução cariotípica no gênero. Logo, torna-se importante o emprego de técnicas de citogenética no estudo da evolução cariotípica em *Pipa*, que podem fornecer dados úteis para o entendimento de tal variação cromossômica numérica.

2.3. O uso de sequências repetitivas

DNAs repetitivos são sequências de DNA de tamanhos variados, a maioria dos organismos possui em seu genoma múltiplas cópias delas (Kidwell, 2002; González *et al.*, 2012). Estas sequências podem estar organizadas sequencialmente em uma porção cromossômica *-in tandem-* (como os genes ribossomais), ou dispersas no genoma (elementos de transposição), podendo ou não ter atividade transcricional. Dentre as sequências organizadas *in tandem* estão as sequências de DNAs satélites (satDNA), minissatélites, microsatélites e as famílias multigênicas (Charlesworth *et al.*, 1994; Sobti *et al.*, 2002).

Durante muito tempo esses DNA repetitivos foram considerados DNA “lixo”, por não terem função conhecida (Palazzo & Gregory, 2014; Doolittle, 2012). Entretanto, atualmente admite-se que sequências repetitivas tenham uma função estrutural, e que sejam de grande importância para a evolução do genoma de diversos organismos (Biémont & Vieira, 2006; Biscotti *et al.*, 2015; Janssen *et al.*, 2018). Essa sugestão é suportada pelo fato de que vários tipos de cópias de DNA repetitivo estão intimamente associados com regiões heterocromáticas, sendo o seu principal componente, encontrado em regiões pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, podendo também ser encontrados ocupando *loci* intersticiais de cromossomos (Garcia-Ramos, 2017; Janssen *et al.*, 2018; Uno *et al.*, 2019).

Os DNAs repetitivos compreendem uma grande parcela do genoma dos eucariotos e têm se mostrado promissores em estudos relacionados à evolução cromossômica (Bilinski, 2017; Strom *et al.*, 2019). A alta diversidade de sequências de DNAs de caráter repetitivo pode facilitar ou estar envolvidas nas adjacências de rearranjos cromossômicos, contribuindo na diversificação dos cariótipos (Zhang *et al.*, 2015; Getlekha *et al.*, 2016; De Souza & Sousa *et al.*, 2017).

O método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) tem sido utilizado para mapear essas sequências de DNAs repetitivos nos cariótipos, utilizando essas sequências como sondas de DNA. Tal mapeamento é informativo na elaboração de mapas citogenéticos (Murakami *et al.*, 2007; Uno 2008; Shearer *et al.*, 2014), na recuperação de homelogias cromossômicas (Duan *et al.*, 2015; Iwata-Otsubo *et al.*, 2016; Said *et al.*, 2018) e inferências de rearranjos envolvidos na diversificação cariotípica (Santos *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2017).

Comparações sobre a presença e localização dessas sequências entre espécies relacionadas podem fornecer informações sobre sua origem, amplificação/redução e evolução dentro do genoma (Biscotti *et al.*, 2015; Session *et al.*, 2016). São também uma boa ferramenta em estudos citotaxonômicos, pois de acordo com a natureza evolutiva e de sua participação na evolução dos genomas, diferentes sequências repetitivas têm sido alvo em estudos de citogenética em diversos grupos (He *et al.*, 2015; O'Meally *et al.*, 2010; Zadesenets *et al.*, 2012; Petraccioli *et al.*, 2015; Cerutti *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Kretschmer *et al.*, 2018).

Dentre estas sequências, destacam-se os microssatélites, que são formados geralmente por unidades de repetição compostas por dois a seis nucleotídeos (Mayer *et al.*, 2010), organizados em tandem e quando organizados em grandes arranjos também podem ser detectados nos cromossomos por FISH (Ezaz & Deakin, 2014). Assim, os microssatélites podem ser utilizados como um marcador citogenético, sendo em alguns casos importantes na distinção de pares cromossômicos de difícil definição, podem detectar rearranjos cromossômicos em espécies (Ventura *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2012; Peixoto *et al.*, 2015) e permitem diferenciação entre cariótipos indistinguíveis quando foi apenas utilizados métodos de citogenética clássica (Peixoto *et al.*, 2015; Peixoto *et al.*, 2016).

DNAs repetitivos também tem função estrutural nos genomas, como os principais componentes dos centrômeros e dos telômeros dos cromossomos em eucariotos. As repetições teloméricas, que constituem as porções terminais dos cromossomos, são fundamentais na estabilidade cromossômica (Blackburn, 1991; Schmid & Steinlein, 2016). Várias espécies de vertebrados apresentam blocos presentes em regiões intersticiais, centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos (Bolzán & Bianchi, 2006; Amaro-Ghilardi, *et al.*, 2008; Lin & Yan, 2008) e podem representar resquícios de eventos antigos de fusões cromossômicas. Logo, a utilização de sondas teloméricas se torna importante para o mapeamento físico de possíveis rearranjos cromossômicos (Chew *et al.*, 2002; Nanda *et al.*,

2008; Suda *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2009; Schmid & Steilein, 2018; Bolzán, 2017).

Sequências distintas de DNA satélite (satDNA), constituídos de unidades monomérica maiores e mais complexas também são potenciais sondas cromossômicas e seu mapeamento têm gerado informações importantes sobre papel na diversificação cariotípica em plantas (Samoluk *et al.*, 2017; González *et al.*, 2018), peixes (Vicari *et al.*, 2010; Megyeri *et al.*, 2017), gafanhotos (Cabrero *et al.*, 2003; Palacios-gimenez *et al.*, 2018; Ruiz-Ruano, 2018), anfíbios (Picariello *et al.*, 2002; Feliciello *et al.*, 2006), entre outros grupos. A presença de pelo menos uma família de DNA satélite nos centrômeros de vários eucariotos, por exemplo, indica que estas sequências podem desempenhar um papel importante na biologia dos centrômeros (Sharma & Raina, 2005; Tran *et al.*, 2015; Ávila Robledillo *et al.*, 2018), na diferenciação de cromossomos sexuais heteromórficos (Nanda *et al.*, 1992; Gatto *et al.*, 2018) e em cromossomos Bs (Jesus *et al.*, 2003; Milani *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2017).

2.3.1. DNA satélite PcP190

O PcP190 é uma família de DNA satélite com monômeros de 190pb isolados inicialmente do DNA genômico de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), de Palmeiras, Estado da Bahia, Brasil (*Physalaemus cuvieri* Palmeiras – PcP) (Vittorazzi *et al.*, 2011). Essa sequência foi isolada ao acaso quando os autores buscavam por sequências de DNA satélite por meio da metodologia de isolamento com enzimas de restrição. Curiosamente, após isolados, os clones recuperados apresentaram grande similaridade nucleotídica com gene ribossomal 5S (5S rDNA).

Investindo no estudo dessa sequência, Vittorazzi *et al.* (2011) sugeriu que possivelmente este satDNA foi derivado dos genes 5S rDNA. Tal sugestão para a origem dessa família de satDNA é baseada na alta similaridade do PcP190 com uma região de 120 pb do gene de rDNA 5S. Esses 120 pb são praticamente idênticos nos dois tipos de rRNA 5S (tipos I e II) (Vittorazzi *et al.*, 2011). Por outro lado, os 60–91 pb restantes das unidades repetitivas de PcP190 constituem uma região hipervariável entre as sequências de PcP190, que não são semelhantes a nenhuma sequência do rDNA 5S. Sendo assim, a hipótese é que o segmento hipervariável seja relativo ao espaçador não transcrito (NTS) do gene de rDNA 5S (Vittorazzi *et al.* 2011; Vittorazzi *et al.*, 2014; Gatto *et al.*, 2016).

A ocorrência do DNA satélite PcP190 já foi descrita nos genomas de espécies do gênero *Physalaemus* (Vittorazzi *et al.*, 2011; Vittorazzi *et al.*, 2014; Vittorazzi *et al.*, 2016), em *Leptodactylus latrans* (Leptodactylidae) (Vittorazzi *et al.*, 2014), em espécies do gênero *Engystomops* (Leptodactylidae) (Targueta *et al.*, 2018), em *Crossodactylus gaudichaudii* (Hylodidae) (Vittorazzi *et al.*, 2014), em espécies do gênero *Pseudis* (Hylidae) (Gatto *et al.*, 2016; 2018) e em *Proceratophrys boiei* (Odontophrynidae) (Silva *et al.*, 2020). Dentro do nosso grupo de pesquisa, identificamos a

presença desse satDNA em representantes da família Cycloramphidae (Bueno *et al.*, submetido), estendendo assim o número de famílias de anuros que carregam cópias do satDNA PcP190.

Sequências de DNA satélite estão presentes na maioria dos organismos eucarióticos e geralmente são específicos de espécies ou presente em espécies estreitamente relacionadas. Alguns satDNA antigos estão presentes em vários táxons filogeneticamente distantes após terem sido herdados verticalmente (Mravinac & Plohl, 2002; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Samoluk *et al.*, 2017). Isso faz com que, mesmo admitindo-se que em cada espécie esses satDNA evoluam independentemente, similaridade de sequências possam ter sido retidas desde a separação dessas linhagens.

Isso pode ser explicado pelo modelo de biblioteca de DNA repetitivos (Fry & Salser, 1975), onde os padrões de DNA repetitivos apresentados em cada espécie são resultados da flutuação do número de cópias que estas apresentam das sequências presentes nesta biblioteca, sendo que a extensão desta flutuação também pode ser bem distinta em diversos grupos de organismos, representando uma fonte permanente de sequências que podem ser amplificadas de uma forma independente em cada espécie para um DNA satélite dominante. (Pons *et al.*, 2004; Plohl *et al.*, 2012, Garrido-Ramos, 2017).

As diferenças na organização cromossômica envolvendo o satDNA PcP190 demonstram que essa sequência é altamente dinâmica, permitindo distinção de pares homólogos de difícil classificação, como o par cromossômico 3 de *Physalaemus* (Vittorazzi *et al.*, 2014). Interessantemente, nos cromossomos de *Physalaemus ephippifer*, seu acúmulo diferencial nos cromossomos sexuais heteromórficos Z e W da espécie parece sugerir que esse satDNA pode ter contribuído para o processo de diferenciação dos pares homólogos durante o surgimento desse sistema (Vittorazzi *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi observado no sistema sexual ZZ/ZW, observado em *Pseudis tocantins* e de *P. bolbodactyla* (Gatto *et al.*, 2016; Gatto *et al.*, 2018). Em espécies do gênero *Engystomops* a distribuição cromossômica do satDNA PcP190 suporta hipóteses de homeologias cromossômicas presumidas pela morfologia e por dados de bandejamento (Targueta *et al.*, 2018), sendo útil no entendimento da evolução cromossômica do grupo.

2.4. A busca de novos marcadores na “era genômica”

Por muito tempo as sequências repetitivas, incluindo os satDNA, foram deixadas de fora dos grandes projetos de genoma devido as dificuldades na montagem de *contigs* contendo sequências repetidas (Novak *et al.*, 2010, Novak *et al.*, 2013; Lepesant *et al.*, 2012). Uma alternativa para a recuperação destas sequências seria o isolamento e análise de repetições de satDNAs obtidos por métodos de PCR e clonagem, porém, existem muitos monômeros que escapam à clonagem quando isoladas, além disso, há dificuldades adicionais quando por exemplo, uma família de satDNA é mal

representada em um genoma, com pequenas quantidades desta sequência (Macas *et al.*, 2007; Shirasawa *et al.*, 2016).

Obstáculos também surgem quando se lida com espécies que possuem genomas grandes e complexos, devido ao alto conteúdo de sequências repetitivas, a maioria dos clones contém uma baixa densidade de sequências únicas e um alto quantidade de diferentes tipos de sequências repetitivas, dificultando sua caracterização por meio dessa metodologia (Steuernagel *et al.*, 2009; Schmutzer *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a análise de sequências repetitivas encontrou um aliado no sequenciamento de alto rendimento de genomas usando Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequence* - NGS) (Nowak, 2014; Criscione *et al.*, 2014; Mariano *et al.*, 2015).

O NGS é uma tecnologia que oferece inúmeras possibilidades de aplicações, podendo ser usado para construir um novo genoma de um organismo desconhecido, avaliar a variação genética de um organismo contra um genoma de referência existente, analisar globalmente a transcrição de um organismo ou célula a partir do DNA complementar e permite também estudar o epigenoma e mecanismos regulatórios de um organismo (Metzker, 2010; Goldstein *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2015; Park & Kim; 2016; Rehm, 2017).

Um dos motivos que possibilitou esta grande variedade de aplicações é a diminuição dos custos de sequenciamento (van Nimwegen *et al.*, 2016), que atualmente são comuns em universidades e laboratórios particulares. O uso de NGS permitiu a realização de projetos de larga escala, antes muito trabalhosos, como estudos de frequência populacional de variações genéticas (Reuter *et al.*, 2015; Lek *et al.*, 2016).

Ferramentas de bioinformática tem sido desenvolvidas para melhor utilização de dados genômicos, o que permite a identificação de sequências repetitivas de DNA em espécies mesmo sem um genoma de referência (You *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2016; . Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Montero-Mendieta *et al.*, 2017). Estas ferramentas seguem uma abordagem baseada em similaridade que permite a detecção de sequências repetitivas, que são identificados como grupos de sequências frequentemente sobrepostas em comparações de leitura. Assim, estas leituras de sequência podem ser reunidos para gerar *contigs* que representam as sequências repetitivas (Macas *et al.*, 2007; Lepesant *et al.*, 2012; Weiss-Schneeweiss, 2015).

NGS e a análise *in silico* permitiu uma alta produtividade das informações contidas nas leituras do NGS e transformaram o estudo do DNA repetitivo (Holt *et al.*, 2011; Piednoel *et al.*, 2012; Torkamaneh *et al.*, 2016; Xiang & Li 2016). A combinação da análise *in silico* favorece uma análise genômica global detalhada sobre o conteúdo repetitivo de genomas e nos dá a oportunidade de descobrir

sequências repetitivas cujo isolamento era difícil por outros métodos (Buckler *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2017; Vitales *et al.*, 2019).

3- OBJETIVOS

3. A- Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente as espécies do gênero *Pipa* (*P. pipa*, *P. parva* e *P. arrabali*), utilizando marcadores clássicos e moleculares para inferir sobre a evolução cariotípica das espécies e identificar a ocorrência do DNA satélite PcP190 nos genomas de anuros disponíveis.

3.B- Objetivos Específicos:

- Caracterizar citogeneticamente de *P. pipa*, *P. parva* e *P. arrabali* por meio de determinação dos cariótipos, padrão heterocromático e de distribuição das RONS no genoma;
- Mapear cromossomicamente os sítios de DNAs repetitivos nos cromossomos de *P. pipa*, em busca de homeologias cariotípicas.
- Identificar, utilizando uma abordagem *in silico* a ocorrência do DNA satélite PcP190 no genoma de anuros em buscas de respostas sobre sua origem e evolução dentro dessa classe.

CAPÍTULO I

Estudo citogenético comparativo de três espécies de anfíbios do gênero *Pipa* (Pipidae, Anura) com base em marcadores clássicos e moleculares.

Iraíne Duarte¹; Débora Yasmin Sousa¹, Olívia Gabriela Araújo²; Shirlei Maria Recco-Pimentel³, Stenio Eder Vittorazzi¹, Daniel Pacheco Bruschi¹

1 Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil. **2** Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus Rio Claro, Avenida 24 A 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil. **3** Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Avenida Bertrand Russel S/N, Barão Geraldo, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brazil.

Autor correspondente: danielpachecobruschi@gmail.com

Resumo: O gênero *Pipa* corresponde a anfíbios anuros pertencentes à família Pipidae. O gênero *Pipa* agrupa sete espécies: *Pipa carvalhoi*, *Pipa arrabali*, *Pipa aspera*, *Pipa myersi*, *Pipa snethlageae*, *Pipa parva* e *Pipa pipa*. Dessas espécies são conhecidos somente os cariótipos de *P. carvalhoi* (2n=20), de *P. pipa* (2n=22) e *P. parva* (2n=30). Esses poucos dados citogenéticos revelam um complexo cenário de variação cromossômica numérica no gênero *Pipa*. Nesse trabalho descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. arrabali* e redescrevemos os cariótipos de *P. pipa* e *P. parva* adicionando novos marcadores cromossômicos em busca de contribuições para o entendimento da evolução cromossômica do gênero. Foram coletados representantes de *P. pipa*, *P. arrabali* e *P. parva* e as preparações cromossômicas submetidas à coloração convencional com Giemsa, bandamento C e impregnação pela Prata (RON). Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram empregados para o mapeamento de repetições teloméricas e sete repetições microssatélites [CA(15), GA(15), GAA(10), CAG(10), CGC(10), GACA(4), GATA(10)]. Os dados corroboraram 2n=30 cromossomos em *P. parva*, com cariótipo formado exclusivamente por cromossomos telocêntricos, sendo a RON detectada na região subterminal do par 2 e o padrão de bandamento C revelado por blocos de heterocromatina essencialmente centroméricos. *Pipa pipa* apresentou 2n=22 cromossomos, com RON detectada na região pericentromérica do braço curto do par 3. Experimentos de FISH utilizando sequências teloméricas detectaram sinais exclusivamente na região subterminal dos cromossomos e *clusters* de repetições microssatélites foram detectadas na região intersticial e regiões centroméricas dos cromossomos dos quatro maiores pares do cariótipo. Nós descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. arrabali*, constituído por 2n=20 cromossomos, com RON localizada na região pericentromérica do braço longo do par 9. Quando comparamos *P. arrabali* e *P. carvalhoi* descrito em Zattera *et al.*, (2019), essas espécies compartilham de mesmo número cromossômico e morfologia dos pares, no entanto, os cariótipos das espécies são diferenciados pela posição da RON, localizada na região pericentromérica do 9q em *P. arrabali* enquanto em *P. carvalhoi* está na região subterminal desse mesmo braço cromossômico, o que pode ter sido resultado de uma inversão paracêntrica. Reconhecemos homologia na morfologia dos primeiros quatro pares de *P. pipa* e *P. arrabali* e *P. carvalhoi*, que parecem ter retido a condição plesiomórfica para Pipidae. O mapeamento das diferentes repetições microssatélite em *P. pipa* revelou sinais de hibridação, principalmente das repetições GA(15) consistentes com os dados encontrados para *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* (Zattera *et al.*, 2020 submetido). Onde as repetições detectadas diferem dos padrões encontrados em *P. carvalhoi* e em *Xenopus tropicalis*. Estes dados mostram um perfil espécie-específico na organização dessas repetições no cariótipo das espécies, o que pode indicar o potencial desse marcador no estudo da evolução cromossômica do gênero e da família Pipidae.

Palavras-chave: *Pipa*, cariótipo, sequências repetitivas; evolução cromossômica.

Introdução

O gênero *Pipa* Laurenti, 1768 corresponde a anfíbios anuros pertencentes à família Pipidae. Essa família reúne também os gêneros (Frost, 2020): *Xenopus* (Wagler, 1827), *Hymenochirus* (Boulenger, 1896) e *Pseudhymenochirus* (Chanabaud, 1920). Dentro da família, o gênero *Pipa* distingue-se dos demais, dentre várias outras características, pelo fato das fêmeas transportarem os ovos e/ou os girinos em desenvolvimento em seu dorso (Trueb & Cannatella, 1986). Atualmente, o gênero agrupa sete espécies (Frost, 2020): *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937), *Pipa arrabali* (Izecksohn, 1976), *Pipa aspera* (Muller, 1924), *Pipa myersi* (Trueb, 1984), *Pipa snethlageae* (Muller, 1914), *Pipa parva* Ruthven & Gaige, 1923 e *Pipa pipa* (Linnaeus, 1758). O gênero *Pipa* é exclusivamente neotropical (Cannatella & Trueb, 1988) e possui suas espécies distribuídas desde o Panamá Oriental e Trinidad à região tropical da América do Sul, incluindo nordeste da Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana, Suriname, Brasil, Peru e Bolívia (Trueb & Cannatella, 1986; Frost 2020).

O mapeamento de dados cromossômicos das espécies da família Pipidae (Mezzasalma *et al.*, 2015) em filogenias moleculares (Irisarri *et al.*, 2011; Pyron & Wiens, 2011), sugerem que $2n=20$ cromossomos seria o número diploide primitivo de pipídeos, condição observada em *Hymenochirus boettgeri* (Mezzasalma *et al.*, 2015), *Pseudhymenochirus merlini* (Chibanaud, 1920), *Xenopus tropicalis* (= *Silurana tropicalis*) (Gray, 1984) e em *P. carvalhoi* (Pfeuffer-Friederich, 1980; Zattera *et al.*, 2019). Atualmente são conhecidos somente os cariótipos de *P. carvalhoi*, com $2n=20$ (Zattera *et al.*, 2019), de *P. pipa* com o número $2n=22$ (Wickbom, 1950) e *P. parva*, que curiosamente apresenta $2n=30$ cromossomos (Morescalchi, 1968). Esses poucos dados citogenéticos reportam um complexo cenário de evolução cromossômica para o gênero *Pipa*, deixando muitas questões ainda em aberto. A maioria das hipóteses filogenéticas para Pipidae inclui apenas duas ou três espécies de *Pipa* (Irisarri *et al.*, 2011; Pyron & Wiens, 2011), fato esse que deixa lacunas em suas relações intragenéricas. Assim, devido à falta de uma filogenia robusta para o gênero, entender as origens dessa variação cromossômica numérica ($2n=20$, 22 e 30 cromossomos) requer mais detalhes na descrição dos cariótipos, incluindo marcadores que possam diferenciar melhor os cromossomos.

Diferenças na posição de centrômero, localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, constituem características cariotípicas clássicas importantes no entendimento da história evolutiva de grupos relacionados (Barros *et al.*, 2003; Green & Sessions, 2012). Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) permite adicionar marcadores cromossômicos com maior poder de resolução, o que favorece o reconhecimento homeologias cromossômicas, permitindo determinar a origem de rearranjos,

construção de mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas (Gan *et al.*, 2013; Suárez *et al.*, 2013; Matsuda *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Estudo de relações filogenéticas com base em evidências cromossômicas vem contribuindo para a compreensão da taxonomia sistemática e evolutiva dos mais diversos grupos (Šíchová *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014; de Matos *et al.*, 2014; Schmid & Steinlein, 2016; Ferro *et al.*, 2018), sendo uma abordagem importante para fornecer respostas sobre o gênero *Pipa*. Nesse trabalho, redescrevemos o cariótipo de *P. pipa* e *P. parva* adicionando marcadores cromossômicos, e descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. arrabali* em busca de contribuições para o entendimento da evolução cromossômica do gênero.

Material e Métodos

Amostras

Foram coletados animais de quatro localidades, sendo representantes de duas populações de *P. pipa* (dois machos e uma fêmea provenientes do Povoado São Miguel das Correias, Maranhão e três fêmeas provenientes do município de Manoel Urbano, Acre). Um macho de *P. arrabali* foi coletado no município de Paranaíta, Mato Grosso e um indivíduo juvenil de *P. parva* proveniente da localidade de Mérida, Venezuela.

Os espécimes foram fixados em formol a 10%, transferidos para álcool 70% GL e depositados na Coleção de Anfíbios “Célio Fernando Baptista Haddad” (CFBH), da UNESP campus Rio Claro e no Museu de História Natural “Prof. Dr. Adão José Cardoso” (ZUEC) da Unicamp, ambos localizados em no estado de São Paulo, Brasil.

Preparações cromossômicas

Os animais coletados foram submetidos a tratamento com solução de colchicina a 2% (0,02mL/g de peso do animal, injetada intraperitonealmente) por aproximadamente 4h e, posteriormente, anestesiados profundamente utilizando aplicação cutânea de Lidocaína 5% de acordo com os protocolos e recomendações do *Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists* (disponível em: <http://www.asih.org/publications>). As preparações cromossômicas foram realizadas a partir do epitélio do intestino e dos testículos seguindo o método descrito por King & Rofe (1976) e Schmid (1978).

Os cromossomos metafásicos foram submetidos à coloração convencional com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 6,8 para determinação dos cariótipos. O padrão heterocromático foi evidenciado por meio de bandamento C segundo Sumner (1972) e o número e localização das

RONs foram detectados pela técnica de impregnação pela prata (Ag-NOR), segundo Howell & Black (1980). Os cromossomos foram classificados quanto a sua morfologia de acordo com os valores propostos por Green & Sessions (1992).

Sondas das repetições microsatélites e sequências teloméricas (TTAGGG)_n

Repetições microsatélites foram mapeadas nos cariótipos usando sondas de oligonucleotídeos (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CGC)₁₀, (GACA)₄, (GATA)₁₀, marcados diretamente com fluorocromo Cy5 (Sigma Aldrich) na extremidade 5' durante a síntese do DNA. As repetições teloméricas (TTAGGG)_n foram produzidas por amplificação por PCR usando os iniciadores teloméricos F (5' TTAGGG 3') e R (5' CCCTAA 3'), com o produto desta amplificação sendo marcada diretamente pela incorporação 11-digoxigenina-dUTP, seguindo o protocolo descrito de Guerra (2012).

Experimentos por Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Os experimentos de FISH foram baseados no protocolo proposto por Kubat *et al.* (2008). Para repetições teloméricas, as hibridizações foram realizadas de acordo com o protocolo de Traut *et al.* (2001), com as seguintes modificações: as lâminas foram lavadas em HCl 0,2 N por 2 minutos, seguida por duas lavagens no PBST por 3 minutos, com a estrutura da cromatina sendo estabilizada em PBS 1% / 150 mM 1X formaldeído, por 10 minutos, e depois lavadas novamente em PBST por 3 minutos e desidratadas em álcool por séries crescentes (a 70%, 80% e 96%) por 3 minutos. As amostras foram desnaturadas em formamida deionizada a 70% / 2xSSC por 3 minutos e depois desidratadas novamente em uma série crescente de álcool (a 70%, 80% e 96%).

Para hibridação, cada lâmina recebeu uma concentração final de 50ng/uL da sonda. Após 24 horas de hibridação em câmara úmida a 37 °C, as lâminas foram lavadas 2X SSC a 42° C e em PBST por 5 minutos e depois desidratadas novamente em uma série crescente de álcool (a 70%, 80% e 96%) por 3 minutos. As lâminas foram então incubadas em Buffer NFDM por 15 minutos e o sinal foi detectado usando o anticorpo antidigoxigenina no tampão NFDM por 1 hora em uma câmara úmida e escura, em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas novamente, três vezes, em 0,5% / 4xSSC com Tween por 5 minutos, desidratadas na série alcoólica e contrastadas com DAPI.

As imagens de metáfases hibridizadas foram capturadas em Microscópio de Fluorescência Olympus BX-60 e editadas com o auxílio do software Adobe Photoshop CS4 para montagem dos cariótipos.

Resultados

Confirmamos o número diploide $2n=30$ cromossomos em *P. parva*, conforme descrito por Morescalchi (1968). Todos os cromossomos de *P. parva* são de morfologia telocêntrica (Figura 1). A RON foi detectada na região subterminal dos homólogos do par 2 (Figura 1A, em destaque).

O padrão de bandamento C revelou blocos de heterocromatina essencialmente centroméricos em todos os cromossomos do cariótipo de *P. parva* (Figura 1B).

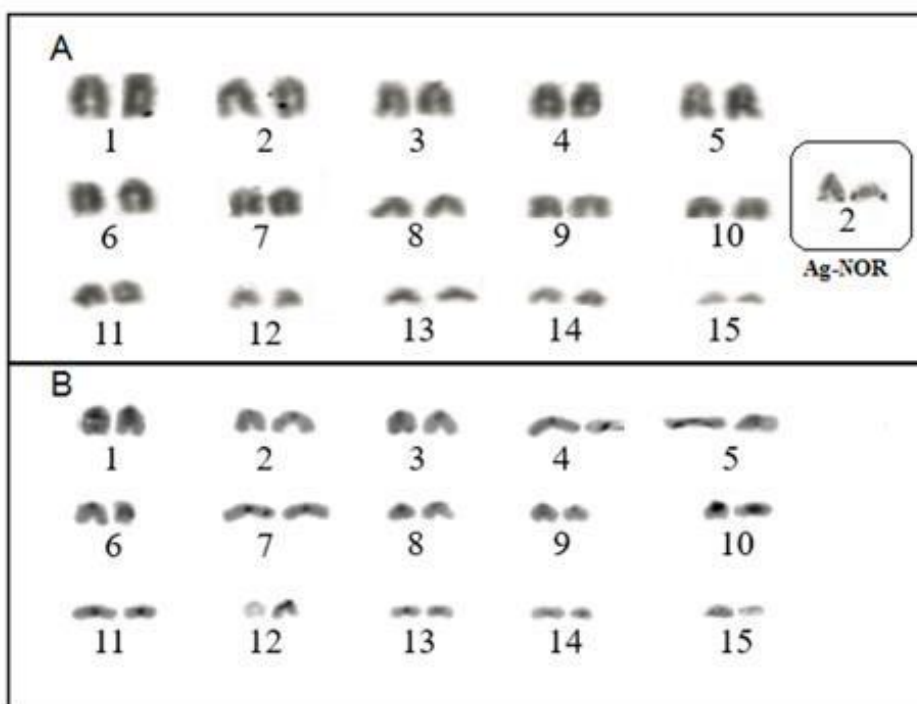


Figura 1. Cariótipo de *Pipa parva*. (A) Cromossomos metafásicos submetidos à coloração convencional com Giemsa, em destaque, o par cromossômico portador das RON. (B) cromossomos metafásicos submetidos ao bandamento C.

O cariótipo de *P. pipa* é composto de $2n=22$ cromossomos, constituído de dois pares de cromossomos metacêntricos (pares 1 e 3), um par submetacêntrico (par 2), um par subtelocêntrico (par 4) e os sete pares restantes todos de morfologia telocêntrica (pares 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) (Figura 2). A RON foi detectada na região pericentromérica do braço longo dos homólogos do par 3 (Figura 2, no destaque). Apesar de inúmeras tentativas, não foi possível determinar com precisão o padrão heterocromático dessa espécie.

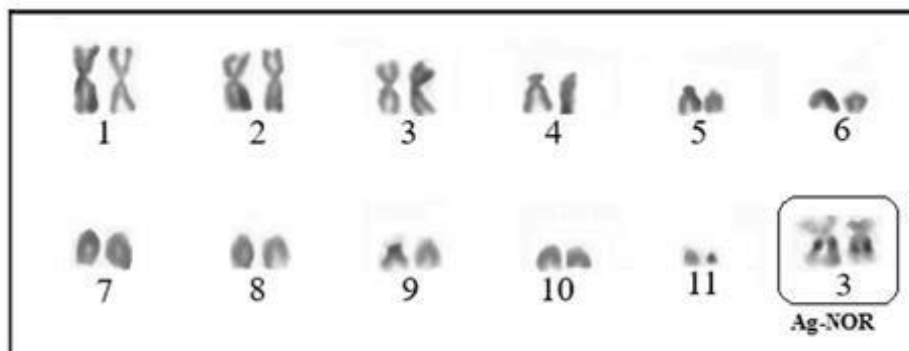


Figura 2. Cromossomos metafásicos de *Pipa pipa* submetidos à coloração convencional com Giemsa e, no destaque, o par cromossômico portador da RON.

Experimentos de hibridação *in situ* utilizando sondas das sequências (TTAGGG) $_n$ revelaram sinais de hibridação detectados em todos os cromossomos do cariótipo de *P. pipa* (Figura 3), localizados exclusivamente na região subterminal dos cromossomos.

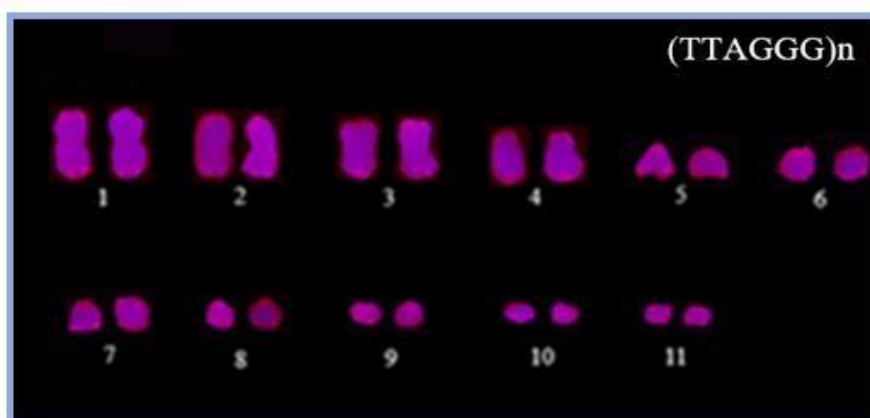


Figura 3. Cromossomos metafásicos submetidos a experimentos de FISH com sonda de repetição telomérica (TTAGGG) $_n$.

A sonda de repetição microssatélite (GATA) $_8$ (Figura 4A), apresentou uma marcação pontual na porção intersticial no braço curto dos homólogos do par 3. Sinais de hibridação com as sondas de repetição microssatélites (CA) $_{15}$, (CAG) $_{10}$, e (GA) $_{15}$ (Figura 2A-D, respectivamente) revelaram marcações predominantemente nas regiões centroméricas dos quatro primeiros pares de cromossomos. Adicionalmente, sinal de hibridação da sonda (CAG) $_{10}$ foi detectado na região centromérica dos homólogos do par 6 (Figura 4C). Não foram detectados sinais de hibridação nos experimentos utilizando as sondas de repetições de trinucleotídeos (GAA) $_{10}$, (CGC) $_{10}$ e do tetranucleotídeo (GACA) $_4$.

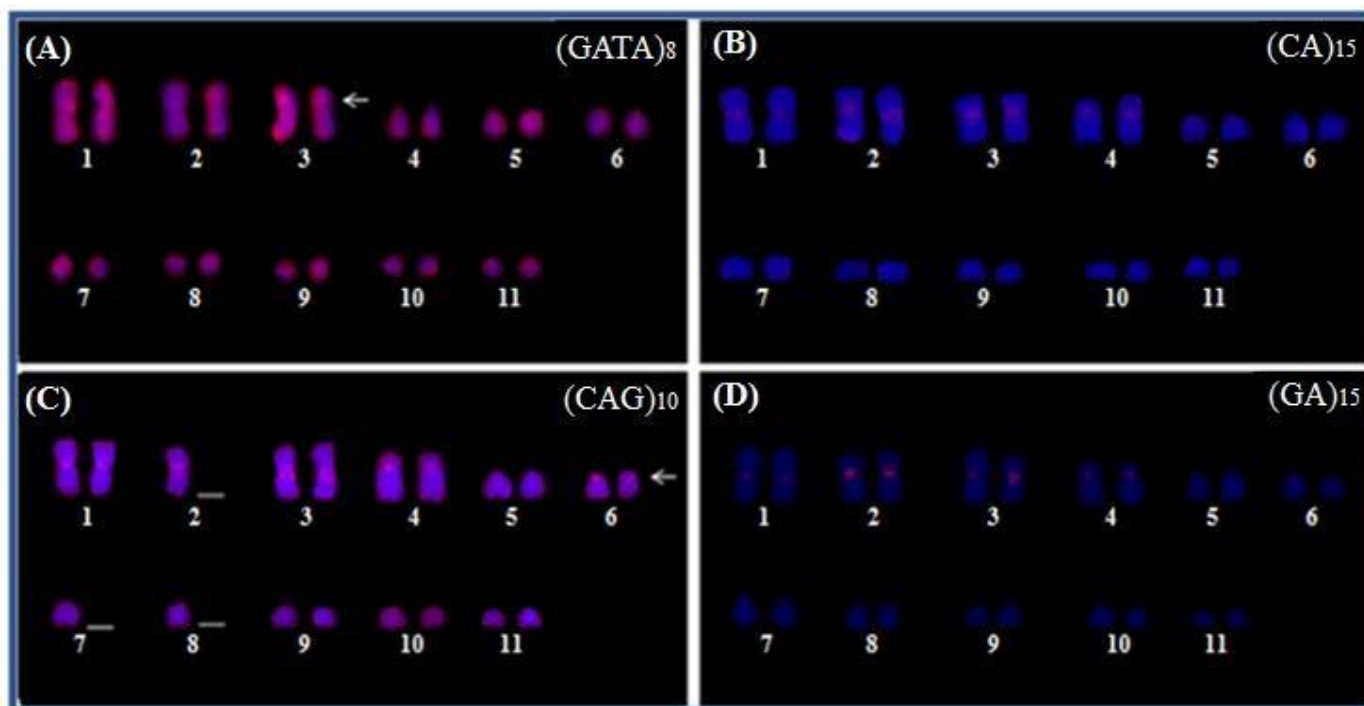


Figura 4. Cromossomos metafásicos submetidos a experimentos de FISH com sondas de repetições microssatélites (GATA)₈, a seta no par 3 indica um sinal intersticial (A); (CA)₁₅ (B); (CAG)₁₀ a seta no par 6 indica um sinal intersticial (C); e (GA)₁₅ (D). Em (C), metáfase parcial.

O cariótipo de *P. arrabali* apresenta cariótipo composto por $2n=20$ cromossomos, constituído de três pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 3 e 8), dois pares submetacêntricos (pares 2 e 7), três pares subtelocêntricos (pares 4, 5 e 6) e dois pares telocêntricos (pares 9 e 10) (Figura 5). A RON está localizada na região pericentromérica do braço longo dos homólogos do par 9 (Figura 5, em destaque).

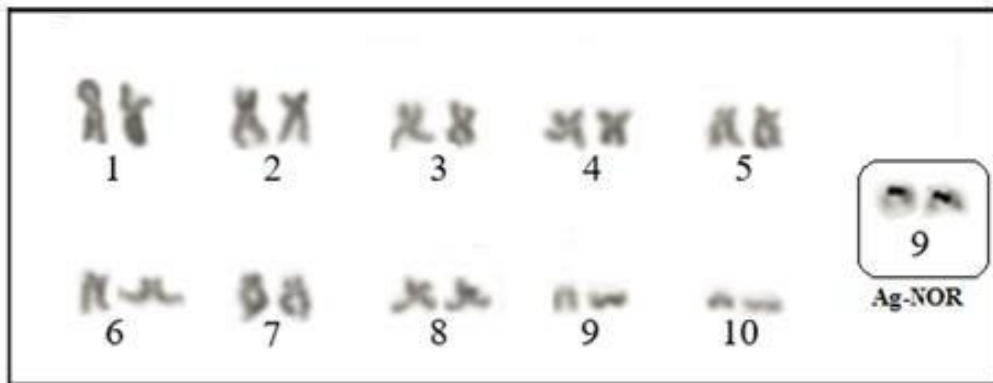


Figura 5. Cromossomos metafásicos de *Pipa arrabali* submetidos à coloração convencional com Giemsa e detecção das RONS pelo método de Impregnação pela Prata. Em destaque, par cromossômico portador das RON.

Discussão

Dados citogenéticos do gênero *Pipa* são limitados à descrição do número e morfologia cromossômica. Além disso, diferenças quanto à classificação da morfologia dos cromossomos dificulta a comparação entre os cariótipos das espécies do gênero (Wickbom, 1950; Morescalchi, 1968; Morescalchi *et al.*, 1970). Sendo assim, reanализamos os cariótipos de duas espécies de *Pipa* (*P. pipa* e *P. parva*) a fim de dar maior resolução para os cromossomos, padronizar a classificação dos mesmos e também descrevemos um novo cariótipo para o gênero (*P. arrabali*). Nossos dados corroboram o número cromossômico de *P. pipa* ($2n=22$) e *P. parva* ($2n=30$) com dados já descritos na literatura (Wickbom, 1950, Morescalchi, 1968). Uma primeira razão que torna os estudos citogenéticos com o gênero *Pipa* escasso é a dificuldade em levantar amostras dessas espécies, pois são animais essencialmente aquáticos de difícil localização. Algumas das espécies tem com raros registros de ocorrência, como por exemplo, as espécies *P. myersi* e *P. aspera* das quais não se tem registro há pelo menos 20 anos. *Pipa aspera* está distribuída no Suriname e na Guiana Francesa (Trueb & Manssemin, 2000) com pouquíssimas ocorrências relatadas, já *P. myersi* possui distribuição em localidades do leste do Panamá e no nordeste da Colômbia (Trueb, 1984) onde, sua falta de ocorrência pode ser devido à fragmentação de habitats naturais da espécie.

A condição plesiomorfica proposta para a família Pipidae é $2n=20$ cromossomos, condição presente tanto o cariótipo de *P. arrabali* (presente estudo) quanto de *P. carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019). Estas duas espécies possuem cromossomos com morfologia muito semelhante para todos os pares do complemento. Além disso, o par cromossômico portador da RON em *P. carvalhoi* (par 9) corresponde ao mesmo par de telocêntricos detectado em *P.*

arrabali, porém, a localização da RON difere entre as duas espécies. Enquanto em *P. arrabali* a RON está localizada na região pericentromérica do 9q, em *P. carvalhoi* a RON foi detectada na região subterminal desse mesmo braço cromossômico (Zattera *et al.*, 2019), o que pode ter sido resultado de uma inversão paracêntrica, resultando em manutenção da morfologia desse cromossomo nas duas espécies. *Pipa arrabali* e *P. carvalhoi* são ambas pertencentes ao grupo das micropipas (Trueb & Canattella, 1985; Trueb & Canattella, 1986), sendo bastante similares morfologicamente. Sugere-se que micropipas devem ter sido resultantes de processos de miniaturização histórica ocorrido na base de seu último ancestral comum, evidenciado pelo monofiletismo recuperado para essas espécies com base em dados morfológicos (Araújo 2019, PhD thesis). É provável que *P. carvalhoi* e *P. arrabali* tenham sofrido um evento histórico vicariante que resultou na diversificação de *P. carvalhoi*, espécie que atualmente possui distribuição isolada ao longo as planícies da costa leste do Brasil, enquanto *P. arrabali* é encontrada ao longo da Guiana, Suriname, leste da Venezuela, norte e centro do Brasil (Trueb & Canattella, 1986).

No cariótipo de *P. pipa* foi observado que os quatro primeiros pares são relativamente maiores que os outros sete pares restantes. Estes primeiros quatro pares possuem a mesma morfologia que os de *P. carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019) e *P. arrabali*, logo, podemos sugerir a homeologia com base na morfologia desses pares cromossômicos entre *P. carvalhoi*, *P. pipa* e *P. arrabali*. Estes pares parecem ter retido a condição plesiomórfica, com morfologia semelhante ao cariótipo ancestral sugerido para Pipidae (Mezzasalma *et al.*, 2015), como também observado no cariótipo de *P. merlini*, *X. tropicalis* e *H. boettgeri*. Assumindo a proposta de cariótipo primitivo para Pipídeos de Mezzasalma *et al.* (2015), verificamos que o cariótipo de *P. pipa* difere dos demais principalmente quanto os sete pares cromossômicos restantes, todos de morfologia telocêntrica. Uma das possibilidades para explicar tais variações seria a ocorrência de fissões cêntricas, resultando em cromossomos com morfologia telocêntrica e no aumento no número cromossômico do cariótipo primitivo $2n=20$ para $2n=22$. Sinais de sequências teloméricas intersticiais (ITSs) poderiam ser uma evidência a favor dessa nossa hipótese, no entanto, o mapeamento *in situ* da sonda (TTAGGG) $_n$ revelaram apenas sinais nas posições terminais de todos os cromossomos. A ausência de ITSs não é suficiente para invalidar essa hipótese, uma vez que sinais de reposicionamento de telômeros, quando muito antigos, podem ser apagados dos genomas por homogenização das sequências (Bolzán, 2017). O fato do gênero não possuir uma filogenia robusta também não nos permite direcionar os eventos de rearranjos que

possivelmente ocorreram e levaram a uma diversificação cromossômica a partir do cariótipo ancestral $2n=20$.

O mapeamento das diferentes repetições de microssatélites no cariótipo de *P. pipa* evidenciou que esses motivos repetitivos estão organizados em *clusters* localizados preferencialmente nas regiões centroméricas dos quatro primeiros cromossomos do cariótipo, principalmente as repetições CA(15), GA(15) e CAG(10). Geralmente essas sequências se acumulam perto de regiões caracterizadas por baixos níveis de recombinação, como regiões heterocromáticas encontradas em regiões subterminais e centroméricas (Stephan & Walsh, 2013; Cioffi *et al.*, 2012). Ao compararmos os sinais microssatélite em *P. pipa* e compararmos com os sinais mapeados em *Pipa carvalhoi* e *Xenopus tropicalis*, caracterizados no trabalho de Zattera *et al.* (2020, submetido), padrões distintos de distribuição dos sinais de hibridação dos oligonucleotídeos CA(15) e GA(15) foram evidentes entre as três espécies; no cariótipo de *P. carvalhoi* há sinais em ambas as regiões centroméricas e pericentroméricas para todos os pares cromossômicos, enquanto em *X. tropicalis* essas repetições foram encontradas principalmente nas regiões subterminais de todos os pares. Essas marcações contrastam com os sinais pontuais detectados na região centromérica somente dos quatro primeiros pares do cariótipo de *P. pipa*. Os motivos (CAG)₁₀ e (GATA)₈ em *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* estão localizados na região subterminal de todos os pares, com marcações intersticiais pontuais, já em *P. pipa*, além da região centromérica dos quatro primeiros pares, a repetição CAG(10) também apresentou um sinal no par seis e (GATA)₈ apresentou distribuição na região intersticial do braço curto par 3. Assim como em *X. tropicalis*, os sinais para os microssatélites (GAA)₁₀ e (GACA)₄ não foram detectados em *P. pipa*, embora não seja possível descartar completamente a ausência total desses motivos no genoma de *P. pipa* e de *X. Tropicalis*. A localização e comparação desses motivos microssatélites indicam que a divergência observada nas espécies ocorreu de forma independente por mecanismos de amplificação e deleção de famílias de DNA repetitivo que, consequentemente, leva a formação de novos perfis cromossômicos de repetitivos.

Estes resultados revelam diferenças específicas para *P. pipa*, contribuindo para a compreensão na organização do DNA repetitivo no cariótipo desta espécie. Infelizmente, devido a baixa qualidade das preparações cromossômicas de *P. arrabali* e *P. parva*, não foi possível até o momento detectar a distribuição desses marcadores em seus cariótipos e futuros trabalhos investirão nesses experimentos.

Microssatélites são componentes hipervariáveis nos genomas (Kidwell, 2002). Essas repetições são geralmente associadas a regiões heterocromáticas dos genomas e muitas delas são encontradas nas regiões centroméricas e subterminais dos cromossomos (Cioffi & Bertollo, 2012), tais como observadas nesses cariótipos. A composição do DNA repetitivo que compõe essas regiões pode variar entre espécies intimamente relacionadas (Plohl *et al.*, 2010). Essa característica variável pode eventualmente ser extremamente útil na diferenciação dos cariótipos e por isso, parece ser um marcador promissor no estudo de anfíbios. Recentemente, Peixoto *et al.*, (2016) revelaram que, embora o cariótipo de *Ololygon tripui*, pertencente a família Hylidae, sejam conservados na maioria dos caracteres citogenéticos do gênero ($2n = 24$ e $FN = 48$, localização da NOR), o padrão de organização de microssatélites no cariótipo de *O. tripui* difere das espécies *O. arduoa*, *O. belloni* e *O. cosenzai* (Peixoto *et al.*, 2015), onde *O. tripui* apresenta marcações únicas que provavelmente resultantes de uma evolução independente destas sequências no genoma, reforçando o potencial desses marcadores na citogenética comparativa de anuros.

Conclusões

Neste estudo, a utilização de técnicas citogenéticas diversificadas permitiu a descrição de um novo cariótipo para o gênero *Pipa* (*P. arrabali*). Além disso, os dados fornecem informações importantes como a localização da RON em *P. parva*, *P. pipa* e *P. arrabali*, sendo uma novidade para estas espécies. A localização da RON nos homólogos do par 9 de *Pipa arrabali* ao comparar com o a RON detectada em *P. carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019) representou um marcador importante para o estudo entre estas espécies, evidenciando a ocorrência de uma possível inversão paracêntrica durante a diversificação desses cariótipos.

A aplicação de sondas repetitivas de DNA por microssatélites indicou que este marcador pode ser útil em análises evolutivas dentro do gênero *Pipa*, pois possibilitou diferenciar o cariótipo de *P. pipa*, através de um padrão de sinais destas sequências, permitindo a análise e comparação entre as espécies e contribuindo para o melhor conhecimento da sua organização cromossômica e dos processos envolvidos na diversificação cariotípica deste gênero.

Referências

- BARROS, M. C.; SAMPAIO, I. & SCHNEIDER, H. 2003. Mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. **Genetics and Molecular Biology** 26(1):5-11. 2003
- BOLZÁN A.D. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. *Mutat Res - Rev Mutat. Res* 773:51-65. 2017.
- CANNATELLA, D. C. A phylogeny of primitive frogs (archaeobatrachians). **Tese de doutorado**, The University of Kansas, Lawrence. *EUA*, 1985.
- CANNATELLA, D. C.; TRUEB, L. Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 94, n. 1, p. 1–38, 1988.
- CARVALHO, M. A. et al. Dynamics of chromosomal evolution in the genus *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 7826–7838, 2014.
- CIOFFI MB., MARTINS C., BERTOLO L.A.C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genet** 10:34. 2009.
- CIOFFI, MB., KEJNOVSKÝ E., MARQUIONI V., POLTRONIERI J., MOLINA WF., DINIZ D., BERTOLLO, L.A.C. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular Cytogenetics** 5: 28. 2012.
- DE MATTOS, T. L. et al. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). **BMC Genetics**, v. 15, 2014.
- FERRO, J. M. et al. Chromosome evolution in *Cophomantini* (Amphibia, Anura, Hylineae). **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–29, 2018.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: **an Online Reference**. American Museum of Natural History, New York. [Electronic Database] <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. [Version 6.0 accessed 09. March 2020].
- GAN, Y. et al. Chromosomal Locations of 5S and 45S rDNA in *Gossypium* Genus and Its Phylogenetic Implications Revealed by FISH. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.
- GREEN, D.M; SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego, 1992: **Academic Press**; 431–432.. ED. 2012.
- GUERRA, M. Citogenética Molecular: Protocolos Comentados, 1st edition. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 124pp. 2012.

- HAN, Y. H. et al. Centromere repositioning in cucurbit species: Implication of the genomic impact from centromere activation and inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 14937-14941, 2009.
- HOWELL, W.M; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: A 1 step method. **Experientia** 36:1014-1015. 1980.
- IRISARRI, I. et al. Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.
- IZECKSOHN, E. Uma nova especie de *Pipa*, do estado do Amazonas, Brasil (Amphibia, Anura, Pipidae). **Rev. Brasil. Biol.** 36:507-510. 1976.
- KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. V.115, p49-63, 2002.
- KING, M; ROFE R. Karyotypic variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma** 54:75-87. 1976.
- KUBAT, Z; HOBZA, R; VYSKOT, B; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome** 51:350–356. 2008.
- LIU, Y. et al. Chromosomal Evolution in the *Amolops mantzorum* Species Group (Ranidae; Anura) Narrated by Repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157, n. 3, p. 172–178, 2019.
- MATSUDA, Y. et al. A New Nomenclature of *Xenopus laevis* Chromosomes Based on the Phylogenetic Relationship to *Silurana/Xenopus tropicalis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 3–4, p. 187–191, 2015.
- MEZZASALMA, M. et al. Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 47–53, 2015.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. Sobre uma collecção de vertebrados do nordeste brasileiro. Primeira parte: Peixes e batrachios. **O Campo**, v. 8, p. 54–56, 1937.
- MORESCALCHI, A. Karyology of the main groups of African frogs. *Monitore Zoologico Italiano*, **Supplemento**, v. 15, n. 1, p. 41–53, 1981.
- MULLER. Neue oder seltene Reptilien und Ba-trachier der Zoologischen Sammlung der bayerischen Staates. **Zool. Anz.**, Leipzig 58:291-297. 1924.
- MULLER, L. On a new species of the genus *Pipa* from northern Brazil. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 14:102. 1914.
- PEIXOTO, M.A.A., OLIVEIRA, M.P.C., FEIO, R.N., DERGAM J.Á. Karyological study of *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. **CCG** 10:505-516. 2016.

PEIXOTO, M.A.A.; LACERDA, J.V.A.; COELHO-AUGUSTO, C.; FEIO, R.N.; DERGAM, J.A. The karyotypes of five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. **Genetica** 143:729-739. 2015.

PFEUFFER-FRIEDERICH, I. Karyotypanalyse mit methodischen Vergleichen beider Wabenkröte *Pipa carvalhoi*. Universität Mainz, Diplomarbeit (**unpublished degree thesis**). 1980.

PLOHL, M. Those mysterious sequences of satellite DNAs. **Periodicum Biologorum**, v. 112, n. 4, p. 403–410, 2010.

PYRON, R.A., WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Mol. Phylogenet. Evol.** 61, 543–583. 2011.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C. Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148, n. 2–3, p. 211–226, 2016.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia - I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66:361-388. 1978.

ŠÍCHOVÁ, J. et al. Chromosomal Evolution in Tortricid Moths: Conserved Karyotypes with Diverged Features. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 23–28, 2013.

STEPHAN, W., WALSH, B. Repetitive DNA: Evolution. eLS. doi: 10.1002/9780470015902.a0001700.pub2. 2013.

SUÁREZ, P. et al. Chromosome evolution in *Dendropsophini* (amphibia, anura, hylinae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 4, p. 295–308, 2013.

SUMNER A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 83: 438–442. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7). 1972.

TRUEB, L.; MASSEMIN, S. D. The osteology and relationships of *Pipa aspersa* (Amphibia: Anura: Pipidae), with notes on its natural history in French Guiana. **Amphibia-Reptilia**, v. 22, n. 1986, p. 33–54, 2000.

TRUEB, L.; CANNATELLA, D. C. Systematics, morphology, and phylogeny of genus *Pipa* (ANURA: PIPIDAE). **Herpetologica**, v. 42, n. 4, p. 412–449, 1986.

TRUEB, L. Description of a New Species of *Pipa* (Anura: Pipidae) from Panama. **Herpetologica**, v. 40, n. 3, p. 225–234, 1984.

RUTHVEN, A. G.; GAIGE, H. T. Description of a new species of *Pipa* from Venezuela. **Occasional Papers of the Museum of Zoology**. University of Michigan, v. 136, p. 1–2, 1923.

WICKBOM, T. The chromosomes of *Pipa pipa*. **Hereditas**, n.36, p.363-370, 1950.

ZATTERA, M. L. et al. Chromosome spreading of the (TTAGGG)_n repeats in the *Pipa carvalhoi* Miranda-Ribeiro, 1937 (Pipidae, Anura) karyotype. **Comparative Cytogenetics**, v. 13, n. 3, p. 297–309, 2019.

CAPÍTULO II

Detecção in silico do satDNA PcP190 em genomas de anuros sequenciados

Iraine Duarte¹; Jhonny Ferreira de Sousa¹; Kaleb Pretto Gatto²; Stenio Eder Vittorazzi¹, Daniel Pacheco Bruschi¹

1 Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil. *2* Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (Unesp - Rio Claro), Rio Claro, São Paulo. *3* Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Avenida Bertrand Russel S/N, Barão Geraldo, 13083-865, Campinas, São Paulo State, Brazil. Autor correspondente: danielpachecobruschi@gmail.com

Resumo: DNAs satélites (satDNAs) compreendem longos arranjos de sequências repetitivas organizadas *in tandem*. Devido ao alto potencial de variação nas sequências, perfis de satDNAs espécies-específicos podem surgir independentemente dentro de um conjunto de sequências compartilhadas por um grupo de espécies. Dentre as famílias de DNA satélites já isolados em espécies de anfíbios, o satDNA PcP190 se destaca por aparente distribuição em diferentes ramos da árvore evolutiva dos anuros. Nesse trabalho, desenvolvemos uma estratégia de amostragem de dados genômicos brutos para avaliar a ocorrência do DNA satélite PcP190 nos genomas de 23 espécies de anuros disponíveis na plataforma pública de acesso de dados *Sequence Read Archive* (SRAS). Foram utilizadas as sequências do satDNA PcP190 para o mapeamento das *reads* nas espécies de anuros com genomas disponíveis e utilizadas para a construção de uma sequência consenso para as buscas genômicas. Somente a região mais conservada destas sequências foi selecionada como *query*. O mapeamento de *reads* foi realizado pelo aplicativo BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*) e para conversão e manipulação das sequências foi utilizado o programa *Samtools*. A visualização dos dados foi realizada através do software *Tablet*. Para mapear dados de presença/ausência de *reads*, reconstruímos um cladograma na plataforma *TimeTree*, entre as espécies com genomas amostrados e espécies previamente relatadas com presença do PcP190. Nossos dados reportam pela primeira vez a presença de cópias de sequências da família PcP190 em quatro espécies, duas espécies da família Hylidae, uma de Bufonidae e outra de Dendrobatidae. O surgimento e manutenção desta sequência tem sido baseada em dois mecanismos evolutivos: *Concerted evolution* e *birth-and death*. O alinhamento das sequências de satDNA PcP190, oriunda de diferentes espécies, apresentou uma região de 122pb com alta similaridade e, mesmo dentro do genoma de uma mesma espécie, *reads* foram mapeados utilizando *queries* de diferentes espécies, reforçando a conservação entre essas sequências. Embora as famílias de satDNA normalmente apresentem uma natureza com perfil espécie-específica, casos de satDNAs antigos e presentes em táxons filogenéticos distantes podem exibir grande similaridade ou isto pode ocorrer devido a uma alta pressão seletiva sobre essas sequências como resultado de uma possível função genômica. Outro achado foi a variação do número de *reads* mapeados no genoma de duas espécies filogeneticamente relacionadas. Esses dados podem ser explicados pelo fato de espécies filogeneticamente relacionadas compartilharem uma biblioteca de DNAs repetitivos. Segundo esta hipótese, a expansão de diferentes famílias de satDNA ocorre de maneira independente em diferentes linhagens após seu processo de divergência, onde os padrões de DNA repetitivos apresentados em cada espécie são resultados da flutuação do número de cópias que estas apresentam das sequências presentes nesta biblioteca. Estes dados fornecem um interessante direcionamento quanto a busca deste DNA satélite em espécies filogeneticamente próximas, e representam uma excelente estratégia inicial de *screening* por sequências em genomas sequenciados antes da realização de ensaios *in situ*, além de fornecer um modelo de busca e caracterização de diferentes sequências nos genomas disponíveis.

Palavras- chave: satDNA, PcP190, Anura, citogenômica

Introdução

O termo DNA satélite (satDNA) é aplicado a qualquer conjunto de sequências com centenas a milhares de unidades repetitivas localizadas na heterocromatina constitutiva, sendo definidas classicamente como repetições *in tandem*, ou seja, de forma consecutiva e geralmente com monômeros de cerca de 150-180 pb variando até 300-360 pb (Garcia- Ramos, 2017). Os satDNA são os principais componentes da heterocromatina, encontrados em porções centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, além disso, podem ser encontrados também ocupando loci intersticiais dos cromossomos (Plohl *et al.*, 2014; Garrido-Ramos, 2015).

O principal processo de evolução dessas sequências ocorre de forma conjunta (evolução em concerto – *Concerted Evolution*), embora a homogeneização possa ser incompleta ou ocorra lentamente (Dover, 1986; Nei & Rooney, 2005; Hemleben *et al.*, 2007), fato que faz dessas unidades repetitivas virtualmente iguais em um mesmo arranjo.

As famílias de satDNA podem apresentar perfis cromossomo específicos ou espécie-específicos (Nagaki *et al.*, 2003), enquanto outras podem estar presentes de forma mais abrangente em um grupo de espécies (Macas *et al.*, 2002) ou gêneros relacionados (Rosato *et al.*, 2012). Logo, devido ao alto potencial de variação nas sequências, perfis de satDNAs podem surgir por meio da amplificação ou contração independente de um determinado monômero dentro de um conjunto de sequências compartilhadas por um grupo de espécies. Esta hipótese é denominada de biblioteca de DNAs satélites (*Satellite DNA library*) (Fry & Salser, 1977, Mestrovic *et al.*, 2008; Garcia- Ramos, 2017) e parece explicar bem a dinâmica evolutiva dessas sequências nos genomas.

Dentre as famílias de DNA satélites já isolados em espécies de anfíbios, o satDNA PcP190 aparentemente está distribuído em diferentes ramos da árvore evolutiva dos anuros (Vittorazzi *et al.*, 2014; Gatto *et al.*, 2016; Targueta *et al.*, 2018). Esta família de DNA satélite foi descrita pela primeira vez no trabalho de Vittorazzi *et al.* (2011), onde as sequências foram obtidas a partir do DNA genômico de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae), de Palmeiras, Estado da Bahia, Brasil, do qual surgiu a origem do seu nome. O PcP190 é uma sequência de 190 pb provavelmente derivada do gene rDNA 5S, sugestão respaldada devido à alta similaridade entre a região transcritora dos rDNA 5S tipos I e II em anuros e das sequências de PcP190 e também pela sobreposição cromossômica de motivos rDNA 5S e PcP190 (Vittorazzi *et al.*, 2011).

A ocorrência do DNA satélite PcP190 já foi descrita nos genomas de espécies do gênero *Physalaemus* (Vittorazzi *et al.*, 2011; Vittorazzi *et al.*, 2014; Vittorazzi *et al.*, 2016), em

Leptodactylus latrans (Leptodactylidae) (Vittorazzi *et al.*, 2014), em espécies do gênero *Engystomops* (Leptodactylidae) (Targueta *et al.*, 2018), em *Crossodactylus gaudichaudii* (Hylodidae) (Vittorazzi *et al.*, 2014), em espécies do gênero *Pseudis* (Hylidae) (Gatto *et al.*, 2016; 2018) e em *Proceratophrys boiei* (Odontophrynidae) (Silva *et al.*, 2020). Dentro do nosso grupo de pesquisa, identificamos a presença desse satDNA em representantes da família Cycloramphidae (Bueno *et al.*, *in prepar.*), estendendo assim o número de famílias de anuros que carregam cópias do satDNA PcP190 em seus genomas e mostrando que essas sequências são amplamente distribuídas e conservadas nesses anuros por pelo menos 76 milhões de anos (Feng *et al.*, 2017).

As diferenças na organização cromossômica envolvendo o satDNA PcP190 demonstram que essas sequências são altamente dinâmicas, pois sua localização cromossômica contribuiu na diferenciação de cariótipos de sete espécies de *Physalaemus*, além de distinguir cariótipos de pelo menos três populações de *P. cuvieri* (Vittorazzi *et al.*, 2014, 2016). Além disso, permitiu a distinção de pares homólogos, como o par cromossômico 3 de *Physalaemus* (Vittorazzi *et al.*, 2014). Nos cromossomos de *P. ephippifer*, seu acúmulo diferencial nos cromossomos sexuais heteromórficos Z e W da espécie, parece sugerir que esse satDNA possa ter contribuído para o processo de diferenciação dos pares homólogos durante o surgimento desse sistema (Vittorazzi *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi observado no sistema sexual ZZ/ZW de *Pseudis tocantins* e de *P. bolbodactyla* (Gatto *et al.*, 2016; Gatto *et al.*, 2018). Em espécies do gênero *Engystomops* a distribuição cromossômica do satDNA PcP190 suporta hipóteses de homeologias cromossômicas presumidas pela morfologia e por dados de bandejamento (Targueta *et al.*, 2018).

A caracterização dessas sequências pelos métodos tradicionais de isolamento dos genomas é algo laborioso, exigindo etapas de isolamento por PCR ou enzima de restrição, clonagem e sequenciamento de um grande volume de clones. Estratégias de busca por sequências utilizando bioinformática têm facilitado a busca por sequências dessa natureza nos genomas. No entanto, o número de genomas totalmente montados ainda é pequeno e muitos exibem má qualidade de montagem de regiões repetitivas. Elementos altamente repetitivos são omitidos nas montagens de alguns dos genomas disponíveis ou se encontram pouco caracterizados. Além disso, a maioria das ferramentas de bioinformática existentes requerem a montagem de genomas completos ou dependem de pesquisas de similaridade com bancos de dados de elementos repetitivos já conhecidos (Novak *et al.*, 2010; Nova *et al.*, 2013).

Assim, nos últimos anos, as estratégias para melhorar as buscas genômicas a partir de dados brutos de sequenciamento têm ganhado bastante atenção entre os pesquisadores (Cegan

et al., 2012; Kawahara *et al.*, 2013; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016), especialmente por permitir a utilização de genomas sequenciados com baixas coberturas, mas suficientes para que as famílias de elementos repetitivos mais abundantes estejam representadas nos dados gerados e possam ser efetivamente caracterizadas e estudadas (Harismendy *et al.*, 2009; Treangen & Salzberg, 2012).

Nesse trabalho, desenvolvemos uma estratégia de amostragem de dados brutos para avaliar a distribuição do satDNA PcP190 nos genomas de anuros disponíveis em plataformas públicas de acesso de dados e assim, fornecer evidências sobre a origem dessas sequências repetitivas nos genomas de outros Anuros.

Materiais e métodos

Foram utilizados dados de *Sequence Read Archive* (SRAS) disponíveis no *Sequence Read Archive* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>). Essa plataforma arquiva dados de sequenciamento bruto e informações de alinhamentos de diferentes plataformas de sequenciamento *high-throughout*, como Roche 454, *Illumina Genome Analyzer* e *Applied Biosystems* (Leinonen *et al.*, 2010). Dados de leitura não montados disponíveis no SRA são oriundos tanto de projetos de sequenciamento de genoma quanto para metagenômica (Mukherjee *et al.*, 2018).

Foram identificadas todas as SRAs disponíveis no NCBI para anuros e a escolha da biblioteca de leitura de cada espécie foi realizada com base na mais atual e com maior tamanho disponibilizado (Tabela 1).

Tabela1. Listagem das espécies amostradas, família e respectivo número de acesso dos dados de *Sequence Read Archive* (SRAs) incluídos em nosso estudo.

Espécies/Famílias	Número de acesso SRAs
Família Ranidae	
<i>Sylvirana latouchii</i>	SRR5248584
<i>Rana temporaria</i>	SRR2226373
<i>Amolops chunganensis</i>	SRR3929656
<i>Amolops mantzorum</i>	SRR5248586
<i>Lithobates catesbeianus</i>	SRR6218679
Família Pipidae	
<i>Xenopus laevis</i>	SRR3210972
<i>Xenopus tropicalis</i>	SRR5110208
<i>Xenopus borealis</i>	SRR6357673
<i>Pipa parva</i>	SRR9309203
<i>Hymenochirus boettgeri</i>	SRR9309200
Família Hylidae	
<i>Hyla arborea</i>	SRR2157967
<i>Hyla chinensis</i>	SRR5248585
<i>Agalychnis moreletii</i>	SRR8327212
Família Scaphiropodidae	
<i>Spea bombifrons</i>	SRR9140157
<i>Spea multiplicata</i>	SRR9140156
<i>Scaphiopus couchii</i>	SRR9140160
<i>Scaphiopus holbrookii</i>	SRR9140159
Família Dicroglossidae	
<i>Quasipaa boulengeri</i>	SRR3929655
<i>Nanorana parkeri</i>	SRR1231543
Família Dendrobatidae	
<i>Oophaga pumilio</i>	SRR7627575
Família Hylodidae	
<i>Hylodes meridionalis</i>	SRR2132056
Família Rhacophoridae	
<i>Rhacophorus chenfui</i>	SRR5248583
Família Bufonidae	
<i>Rhinella marina</i>	ERR2838475
Família Pyxicephalidae	
<i>Amietia hymenopus</i>	SRR7097947

As SRAs foram obtidas através da plataforma online de livre acesso SRA EXPLORER (<https://sra-explorer.info/#>) no formato *.fastq.gz*. Foram selecionadas sequências do satDNA PcP190 disponíveis no Genbank (Vittorazzi *et al.*, 2014, Gatto *et al.*, 2016; Gatto *et al.*, 2018) e utilizadas para a construção de uma sequência consenso para as buscas genômicas. Estas sequências de PcP190 foram alinhadas através do software Geneious 8.0 (Biomatters) e somente a região mais conservada foi selecionada na construção da sequência consenso de PcP190 utilizada como *query* para o mapeamento das *reads*.

Tabela 2. Sequências do satDNA PcP190 isolada de diferentes espécies de anuros e depositadas no GenBank utilizadas nos experimentos de mapeamento de *reads* e seus respectivos números de acesso.

Espécies/Família	Descrição da sequência de satDNA PcP190 utilizada	Nº de acesso no Genbank
<i>Pseudis tocantins</i> (Hylidae)	PcP190-1b-Ptoc-WGA1-C1	J01010.1
	PcP190-6-Ptoc-Z-c1	JF281131.2
	PcP190-7b-Ptoc-M2-C2.1	KX170931.1
	PcP190-7a-ptoc-M2-C21.2	KX170893.1
	PcP190-5-Ptoc-M2-C6-2	JF325847.1
	PcP190-4-Ptoc-W-C1.1	KX170911.1
	PcP-1a-Ptoc-M2-C1	J01009.1
	PcP-2-Ptoc-M1-C1	X12622.1
	PcP-3-Ptoc-W-C11.1	KX170930.1
<i>Leptodactylus latrans</i> (Leptodactylidae)	L.latrans2.1	KM361718.1
<i>Lysapsus limellum</i> (Hylidae)	PcP190-8-Llim-M-C8.1*	KX170908.1
<i>Physalaemus cuvieri</i> (Leptodactylidae)	P.cuvieriBAC1	JF281121.1
<i>Crossodactylus gaudichaudii</i> (Hylodidae)	C.gaudichaudii2	KM361725.1

O mapeamento de *reads* foi realizado pelo aplicativo BWA 0.7.17 (*Burrows-Wheeler Aligner*), que é um pacote de software para mapear sequências pouco divergentes em relação a um genoma de referência. Para a conversão, manipulação e visualização das sequências foi utilizado o programa Samtools 1.9 (*Sequence Alignment/Map*), um pacote para disponibilizar um formato de arquivo flexível. Neste trabalho o Samtools foi utilizado para converter o arquivo resultante do BWA do formato *.sam* para *.bam*, e extrair os *reads* mapeados, ordenar e coletar estatísticas de alinhamento. Estes programas foram utilizados todos na plataforma *Linux*. Dados de presença e ausência do satDNA PcP190 nos genomas foram visualizados no software Tablet

(Milne *et al.*, 2013).

Para avaliar a distribuição dessa sequência ao longo das linhagens de anuros, nós reconstruímos um cladograma entre as espécies com genomas amostrados no presente estudo e espécies previamente relatadas com presença dessa sequência (Tabela 2) (Gatto *et al.*, 2016, Gatto *et al.*, 2018, Vittorazzi *et al.*, 2014). Este dendograma foi construído na plataforma TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times (<http://www.timetree.org/>). Apesar dessa plataforma compilar dados de diferentes filogenias para propor um cladograma capaz de representar as relações evolutivas entre o grupo, a árvore filogenética gerada carece de suporte para alguns grupos devido às inúmeras lacunas de linhagens utilizadas na reconstrução. Nosso intuito com esse cladograma foi recuperar uma árvore que refletisse o posicionamento mais próximo dessas espécies amostradas na árvore da filogenética de anuros e assim mapear dados de presença/ausência de mapeamento de *reads* com similaridade com o satDNA PcP190. Para facilitar a compreensão destas etapas, segue esquema na figura 1.

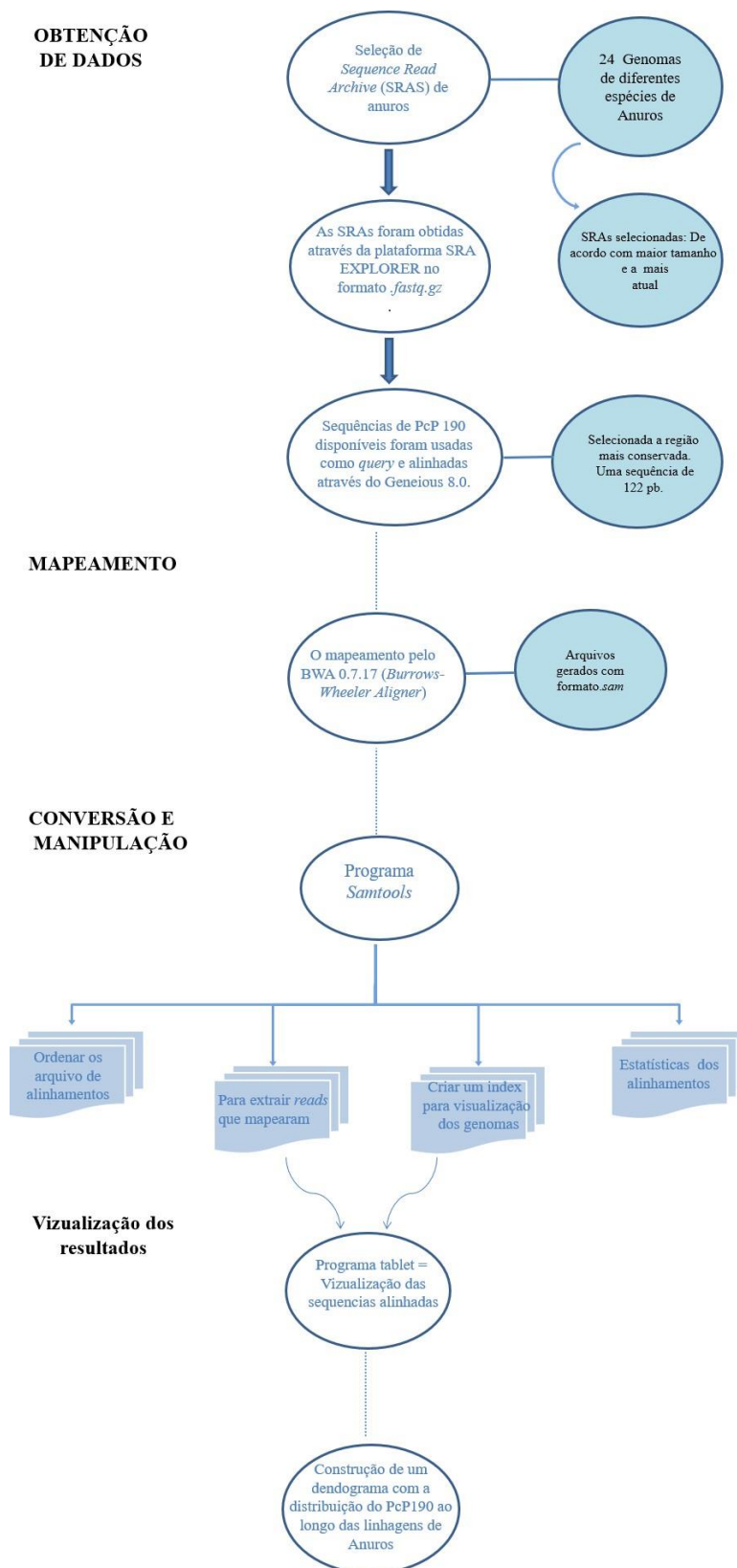


Figura 1. Representação esquemática do *pipeline* desenvolvido para as buscas genômicas implementadas no presente estudo. Para maiores detalhes, ver Materiais e Métodos.

Resultados e discussão

Nossos dados reportam pela primeira vez a presença de cópias de sequências da família PcP190 em quatro espécies de três grandes linhagens de anuros, duas espécies da família Hylidae (*Hyla arborea* e *Hyla chinensis*), e pela primeira vez, nas famílias Bufonidae (*Rhinella marina*) e Dendrobatidae (*Oophaga pumilio*), estendendo assim a presença desse satDNA para mais essas duas famílias. Apesar de representantes de apenas 10 das 54 famílias de anuros (Frost, 2020) terem sido incluídas nessa análise, pudemos obter interessantes informações para a construção de hipóteses sobre o surgimento da sequência PcP190 no genoma desse grupo. Amphibia é uma das classes de vertebrados que apresenta grande variação de tamanho de genomas e evidências sugerem que o grande conteúdo de DNA repetitivo é o principal responsável por esse aumento e um importante substrato por essa rápida taxa de evolução encontrada nesse grupo (Liedtke *et al.*, 2018).

A relação dos grupos que tiveram *reads* mapeados e das espécies que já tinham estas sequências isoladas de seu genoma foi recuperada através da árvore gerada (Figura 2). O fato de termos mapeados sequências de DNA com grande similaridade e cobertura de alinhamento com o satDNA PcP190 em alguns dos genomas estudados não quer dizer que necessariamente essas cópias estejam em uma alta densidade nesses genomas ou que apresentem uma organização condizentes com um DNA satélite propriamente dito. Experimentos adicionais para entender melhor a organização das unidades monoméricas no genoma em questão.

Vittorazzi *et al.* (2014) inferiu que estas sequências possivelmente tenham surgido por duplicação a partir de uma cópia de rDNA 5S há aproximadamente 70 milhões de anos, possivelmente em um último ancestral comum de Hyloidea. Perdas dessa sequência devem ter ocorrido de maneira independente ao longo da evolução das linhagens, como por exemplo, a não detecção por essa metodologia de cópias em *Agalychnis moreletii*.

As famílias onde o PcP190 foram detectados tiveram origem no final do cretáceo superior ao início do paleogeno. Segundo o trabalho de Feng *et al.* (2017), um dos eventos de radiação de anuros, que inclui a superfamília Hyloidea (que representa 54% dos anuros existentes), ocorreu no limite cretáceo-paleogeno. Neste período houve uma extinção em massa em decorrência de diversos eventos, entretanto, esta super extinção acarretou em posteriores radiações explosivas de anuros, criando novas oportunidades ecológicas de diversificação de espécies (Feng *et al.*, 2017). O surgimento do PcP190 antecedendo essa diversificação de várias famílias de anuros, sugere que a rápida radiação desse grupo tenha contribuído para a dispersão do PcP190 nos anuros da superfamília Hyloidea atuais.

A origem da sequência satDNA PcP190 é derivada do DNA ribossomal 5S (Vittorazzi

et al., 2011) e o surgimento e manutenção desta sequência nos genomas tem sido baseada em dois mecanismos evolutivos.: (i) *Concerted evolution*, uma forma de evolução de famílias multigênicas e sequências repetitivas na qual presume-se que as cópias evoluam conjuntamente sofrendo homogeneização intragenômica e por isso, gerando unidades monoméricas virtualmente idênticas ou muito mais similares entre si do que em relação às cópias de outras espécies, e o (ii) segundo é o modelo de *birth-and death*, em que novas cópias são criadas por eventos de duplicação, sendo que algumas cópias são mantidas e acumulam diferenças, podendo algumas cópias degenerar ou tornar-se não funcionais (pseudogenes) e serem eliminadas do genoma (Nei & Roney, 2005,; Rebordinos *et al.*, 2013). Admite-se que o rDNA 5S deva evoluir por um modelo misto entre o surgimento de cópias variantes por *Birth-and- death* seguido de uma homogeneização entre as cópias por *Concerted Evolution* em um mesmo sítio cromossômico (Nei & Roney, 2005). Assim cópias degeneradas do rDNA 5S devem ter dado origem a sequência de PcP190, sendo a expansão no número de cópias e homogeneização das sequências teve um passo determinantes no estabelecimento dessas sequências nos genomas de maneira independente entre as espécies.

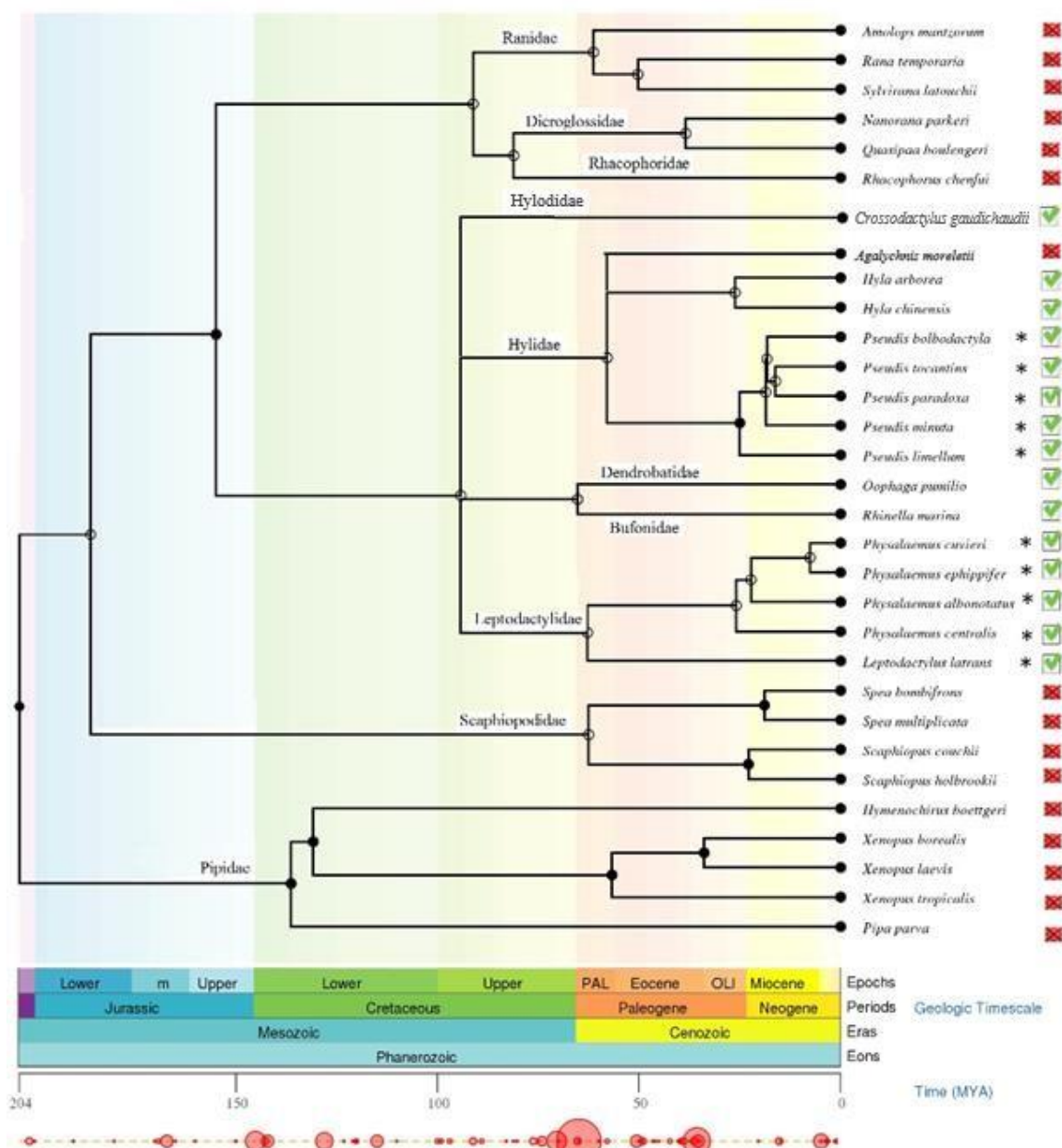


Figura 2. Reconstrução das relações filogenéticas entre as espécies avaliadas quanto a presença/ausência de cópias do satDNA PcP190. As espécies que contêm o símbolo tiveram *reads* mapeados pela primeira vez neste trabalho, as que contêm um * já foram isoladas cópias desse elemento em seus genomas. As espécies que possuem o símbolo não tiveram *reads* mapeados em nossos experimentos.

Quando alinhamos sequências de satDNA PcP190 oriunda de diferentes espécies, uma região de 122 pb conservada apresenta alta similaridade (cerca de 80%; Figura 3), reforçando as sugestões de Vittorazzi *et al.* (2014) e Gatto *et al.* (2016) de uma região ultraconservada nos monômeros do PcP190. Nossas buscas genômicas foram realizadas utilizando essa região de 122 pb (região ultraconservada) do satDNA PcP190, aparentemente originada dos 120 pb do gene de rDNA 5S. Curiosamente, nossas buscas não recuperaram cópias do gene de rDNA 5S em nossos testes de mapeamento de *reads*, fato verificado pela ausência de *reads* mapeados em

muitas das espécies analisadas. Esse resultado nos certifica que essas sequências mapeadas se tratam realmente do PcP190 e não rDNA 5S detectado de maneira inespecífica.

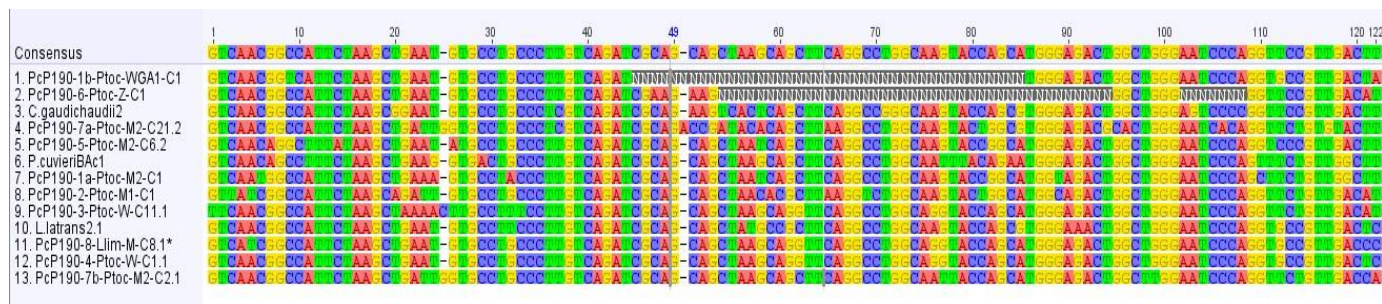


Figura 3. Sequências de satDNA PcP190 alinhadas no programa Geneious 8.0 (Biomatters) e utilizadas como *query* para a busca de *reads* nos genomas de Anuros.

Um fato interessante neste trabalho é que duas destas espécies pertencentes à família Hyliidae (subfamília Hyliinae,) mesmo grupo das espécies do gênero *Pseudis*, apresentaram grande similaridades com as sequências isoladas da espécie *P. tocantins* pertencente a este gênero (Tabela 3), dado recuperado quando observamos a densidade de *reads* mapeados com essa sequência. Diferentes sequências isoladas de *Pseudis tocantins* e utilizadas como *query* em nossa análise, foram mapeadas e variaram no número de *reads* em cada genoma analisado (Tabela 3). Apesar de similares, existem variações entre as sequências de PcP190 dentro de uma mesma espécie, como no caso de *P. tocantins*, o que pode sugerir que o processo de homogeneização pode não ter sido tão eficaz para esse satDNA (Gatto *et al.*, 2016).

Além disso, nossos resultados apontaram que dentro do genoma de uma mesma espécie, *reads* foram mapeados mesmo quando utilizando *queries* de diferentes espécies em uma mesma busca (*Crossodactylus gaudichaudii*, *Leptodactylus latrans* e *Lysapsus limellum*, por exemplo), dado que reforça a semelhança entre essas sequências. Nossa explicação para isso é a de que, embora as famílias de satDNA normalmente apresentem uma natureza específica em cada espécie devido à sua evolução independente, tal similaridade recuperada pode ser evidência de que o PcP190 se trate de uma sequência antiga, por isso restando um grau de similaridade mesmo entre táxons filogenéticos distantes (Robles *et al.*, 2004; Gatto *et al.*, 2016). Além disso, a manutenção dessa sequência pode ser devido a uma alta pressão seletiva sobre essas sequências (ou regiões dessa) como resultado de uma possível função genômica da região mais conservada dessa sequência (Vittorazzi *et al.*, 2014; Gatto *et al.*, 2016). As sequências repetitivas são elementos importantes na evolução do genoma de eucariotos. Sabe-se que a heterocromatina desempenha papéis importantes nos genomas, como por exemplo, na mitose e segregação

cromossômica meiótica (Yamagishi *et al.*, 2008; Ferree & Barbash, 2009) e também pode ser importante para a regulação transcricional de sequências como loci de DNA ribossômico, uma vez que os genes rDNA são frequentemente encontrados em regiões heterocromáticas (Preuss & Pikaard, 2007).

Outro achado no presente estudo foi a variação do número de *reads* mapeados no genoma de duas espécies filogeneticamente muito relacionadas: enquanto em *Hyla arborea* (Hylidae) apresentou um grande número de *reads* mapeados, *Hyla chinensis* (Hylidae) apresentou considerável redução de cópias mapeadas. Esses dados podem ser explicados pelo fato de espécies filogeneticamente relacionadas compartilharem algo conhecido como biblioteca de DNAs repetitivos (Fry & Salser, 1977; Ugarkovic *et al.*, 2002). Porém, os perfis de cada família satélite pode variar bastante em quantidade no genoma de cada espécie. Para o PcP190, essa variação na biblioteca foi observada pela detecção cromossômica nas espécies de *Physalaemus*, a exemplo, *P. albonotatus* apresentou apenas um sítio cromossômico, enquanto *P. centralis* apresentou pelo menos sete sítios (Vittorazzi *et al.*, 2014).

Tabela 3. Espécies que tiveram o satDNA PcP190 mapeados e as sequências isoladas de *Crossodactylus gaudichaudii*, *Pseudis tocantins*, *Lysapsus limellum* e *Leptodactylus latrans* disponibilizadas no GenBank.

Espécies mapeadas	Espécies que tiveram sequências isoladas	Descrição da sequência de satDNA PcP190 utilizada	Nº de <i>reads</i> Mapeados
<i>Hyla arborea</i> (Hylidae)	<i>P. tocantins</i> (Hylidae)	PcP190-5-Ptoc-M2-C6-2	36
		PcP-1a-Ptoc-M2-C1	30.595
		PcP-2-Ptoc-M1-C1	102
		PcP-3-Ptoc-W-C11.1	22
		PcP190-8-Llim-M-C8.1*	750
		PcP190-4-Ptoc-W-C1.1	102
		PcP190-7b-Ptoc-M2-C2.1	6.672
	<i>Crossodactylus gaudichaudii</i> (Hylodidae)	C.gaidichaudii2	5.594
	<i>Leptodactylus latrans</i> (Leptodactylidae)	L.latrans2.1	36
<i>Hyla chinensis</i> (Hylidae)	<i>P. tocantins</i> (Hylidae)	PcP190-5-Ptoc-M2-C6-2	92
		PcP-1a-Ptoc-M2-C1	2
		PcP190-4-Ptoc-W-C1.1	17
	<i>Lysapsus limellum</i> (Hylidae)	PcP190-8-Llim-M-C8.1*	14

<i>Rhinella marina</i> (Bufonidae)	<i>P. tocantins</i> (Hylidae)	PcP190-7a-ptoc-M2-C21.2	918
		PcP190-5-Ptoc-M2-C6-2	51
		PcP-3-Ptoc-W-C11.1	335
		PcP190-4-Ptoc-W-C1.1	70
		PcP190-7b-Ptoc-M2-C2.1	26
		PcP190-8-Llim-M-C8.1*	6

	<i>Crossodactylus gaudichaudii</i> (Hylodidae)	C.gaidichaudii2	92
	<i>Leptodactylus latrans</i> (Leptodactylidae)	L.latrans2.1	6
<i>Oophaga pumilio</i> (Dendrobatidae)	<i>P. tocantins</i> (Hylidae)	PcP190-5-Ptoc-M2-C6-2	6
		PcP-3-Ptoc-W-C11.1	1

Segundo a hipótese de bibliotecas de DNA satélite, a expansão de diferentes famílias de satDNA ocorre de maneira independente em diferentes linhagens após seu processo de divergência. Uma vez que essas espécies relacionadas compartilham um conjunto ancestral de diferentes famílias de satDNA/sequências conservadas, cada uma das quais pode ter sido amplificada diferencialmente em cada espécie. Quando uma família de satDNA é amplificada diferencialmente em uma espécie, exemplares de cópia em baixa quantidade são encontrados em outras espécies relacionadas (Garrido-Ramos, 2017). Segundo este modelo, os padrões de DNA repetitivos apresentados em cada espécie são resultados da flutuação do número de cópias que estas apresentam das sequências presentes nesta biblioteca. De acordo com Plohl *et al.* (2012), esta biblioteca representa uma fonte permanente de sequências que podem ser amplificadas de uma forma independente em cada espécie para um DNA satélite dominante. Estes dados fornecem um interessante direcionamento na busca deste DNA satélite em espécies filogeneticamente próximas, fornecendo estratégias importantes para futuras pesquisas desse satDNA nos genomas dos anuros.

Conclusões

Os dados gerados neste trabalho fornecem um modelo para verificar a presença de diferentes sequências nos genomas e representam uma estratégia inicial de *screening* por sequências em genomas sequenciados antes da realização de ensaios de bancada. Nossos dados direcionam os grupos de anuros que possam ser indicados para validações *in situ* quanto a presença do DNA satélite PcP190.

Através da construção da *pipeline*, nós descrevemos um protocolo que permite a busca e identificação do satDNA PcP190. Esse protocolo permitiu reconhecer essa família de satDNA em quatro novas espécies, pertencentes a três grandes linhagens de anuros, duas espécies da família Hylidae (*Hyla arborea* e *Hyla chinensis*) e pela primeira vez nas famílias Bufonidae (*Rhinella marina*) e na família Dendrobatidae (*Oophaga pumilio*). A variação encontrada no número de *reads* entre as espécies proximamente relacionadas pôde ser explicada pela hipótese de biblioteca de DNAs repetitivos.

Nossos dados reforçam sugestões anteriores de uma região conservada na sequência pcP190, o que sugere uma possível função para tal sequência, despertando interesse para futuros trabalhos especificamente delineados para acessar essas questões.

Referências

- DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**, v. 2, n. C, p. 159–165, 1986.
- FERREE, P. M.; BARBASH, D. A. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 7, n. 10, 2009.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York. [Electronic Database] <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. [Version 6.0 accessed 09. March 2020].
- FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequence of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell** 12: 1069–1084. 1977.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, 2017.
- GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenet. Genome Res.**, 146,153–170. 2015.
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2016.
- GATTO, K. P. et al. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. August, p. 301, 2018.
- HARISMENDY, O. et al. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, 2009.
- HEMBELEN, V.; KOVARIK, A.; TORREZ-RUIZ, R.A.; VOLKOV, R.A.; BERIDZE, T. Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. **Systematics and Biodiversity** 5: 277-289. 2007.
- LIEDTKE, H. C. Macroevolutionary shift in the size of amphibian genomes and the role of life history and climate. **Nature Ecology & Evolution**, 2018.
- MACAS, J.; MÉSZÁROS, T., NOUZOVÁ, M. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. **Bioinformatics** 18: 28-35. 2002.
- MILNE, I.; et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 193-202, 2012.
- NAGAKI, K.; TALBERT P.B.; ZHONG, C.X.; DAWE, R.K.; HENIKOFF, S.; JIANG, J. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. **Genetics** 163: 1221-1225. 2003.
- NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review in Genetics** 39: 121-152. 2005.

- NOVAK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAIŠL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bionformatics** 29: 792–793. 2013.
- NOVAK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC bioinformatics** 11: 378. 2010.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, C. Satellite DNA Evolution. In: Garrido- Ramos MA, ed. **Repetitive DNA**. Basel: Karger, 126–152. 2012.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma** 123, 313–325. 2014.
- PREUSS, S., PIKAARD, C. S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. **Biochim Biophys Acta** 1769: 383–392, 2007.
- REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. **Cytogen Genome Res** 141:103–113. 2013.
- ROBLES,F.; DE LA HERRÁN, R.; LUDWIG, A.; REJÓN, C.R.; REJÓN, M.R.; GARRIDO-RAMOS, M.A. Evolution of ancient satelliteDNAs in sturgeon genomes. **Gene**; 338: 133–142. PMID: 15302414. 2004.
- ROSATO, M. et al. High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae). **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, 2017.
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–14, 2016.
- SILVA, M. J.et al. Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by **Genome Sequencing**. 2020.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; SULESKI, M.; HEDGES, S.B. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. **Molecular Biology and Evolution** 34: 1812–1819, DOI: 10.1093/molbev/msx116. 2017.
- TARGUETA, C. P. et al. ANURAN CYTOGENETICS: AN OVERVIEW. In: Naomi Norris & Carmen Miller. An Essential Guide to Cytogenetics. **Nova Science Publishers**, cap 1, p. 01–64. 2018.
- TREANGEN, T. J.; SALZBERG, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: Computational challenges and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1, p. 36–46, 2012.
- UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles--causes and effects. 68 **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955–9, 2002.
- VITTORAZZI, S. E. *et al.* Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 101–107, 2011.
- VITTORAZZI, S. E. et al. Comparative cytogenetics of *Physalaemus albifrons* and *Physalaemus cuvieri* species groups (Anura, Leptodactylidae). **Comparative Cytogenetics**, v.

8, n. 2, p. 103–124, 2014.

VITTORAZZI, S. E. et al. Chromosomal analysis of *Physalaemus kroyeri* and *Physalaemus cicada* (Anura, Leptodactylidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 2, p. 311–323, 2016.

YAMAGISHI, Y., SAKUNO, T., SHIMURA, M., WATANABE, Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. **Nature** 455: 251–255, 2008.

4. CONCLUSÕES FINAIS

Concluimos que este trabalho alcançou os seguintes objetivos propostos: Caracterizar citogeneticamente as espécies *Pipa pipa*, *P. parva* e *P. arrabali* por meio de determinação dos cariótipos e de distribuição das RONS no genoma, e mapear cromossomicamente os sítios de DNAs repetitivos nos cromossomos de *P. pipa* e identificar, utilizando uma abordagem *in silico* a ocorrência do DNA satélite PcP190 no genoma de anuros em buscas de respostas sobre sua origem e evolução dentro dessa classe.

Nós reanalisamos os cariótipos de *Pipa pipa* $2n=22$ e *Pipa parva* $2n=30$, confirmando seu número cariótipico e morfologia destes cariótipos. Descrevemos o cariótipo de *P. Arrabali*, que apresenta número diplóide $2n=20$. Todas as três espécies tiveram suas RONS mapeadas, sendo A RON de *P. parva*, detectada na região subterminal dos homólogos do par 2. A RON de *Pipa pipa*, detectada na região pericentromérica do braço longo dos homólogos do par 3 e a RON de *P. Arrabali*, localizada na região pericentromérica do braço longo dos homólogos do par 9.

Estes resultados contribuem para uma padronização dos cariótipos de *P. pipa* e *Parva*, padronizando a classificação quanto ao número e morfologia destes. Além de detectar a RON, adicionando mais informações para os cariótipos destas espécies. Pela primeira vez, descrevemos o cariótipo de *Pipa arrabali*. Estes dados permitiram identificar número e morfologia dos cromossomos de *P. arrabali* e junto com a identificação da NOR, nos permitiu inferir sobre seu parentesco com *Pipa carvalhoi* (Zattera *et al.*, 2019).

Os experimentos de hibridização *in situ* com repetições microssatélites e telomérica em *Pipa pipa*, evidenciaram alguns motivos com marcações únicas para o genoma da espécie. Experimentos de hibridação *in situ* utilizando sondas das sequências (TTAGGG) $_n$ revelaram sinais de hibridação detectados em todos os cromossomos do cariótipo de *P. pipa*, localizados exclusivamente na região subterminal dos cromossomos. Já as sondas de repetição microssatélite (GATA) $_8$, (CA) $_{15}$, (CAG) $_{10}$, e (GA) $_{15}$, revelaram marcações predominantemente nas regiões centroméricas dos quatro primeiros pares de cromossomos. Não foram detectados sinais de hibridação nos experimentos utilizando as sondas de repetições de trinucleotídeos (GAA) $_{10}$, (CGC) $_{10}$ e do tetranucleotídeo (GACA) $_4$. Estas marcações únicas encontradas em *P. pipa*, que provavelmente resultaram de uma evolução independente destas sequências no genoma, reforçam o potencial desses marcadores na citogenética comparativa de anuros.

Por fim, utilizando uma abordagem *in silico*, construímos uma *pipeline* onde foi possível verificar a ocorrência do DNA satélite PcP190 no genoma de anuros, estes disponíveis em

plataformas livres, em buscas de respostas sobre origem e evolução dentro dessa classe de sequência.

Esta *pipeline* permitiu identificar esta família de satDNA em quatro novas espécies, pertencentes a três grandes linhagens de anuros, duas espécies da família Hylidae, *Hyla arborea* e *Hyla chinensis*, pela primeira vez nas famílias Bufonidae, na espécie *Rhinella marina* e na família Dendrobatidae, na espécie *Oophaga pumilio*. Uma região conservada de 122 pb foi encontrada na sequência de PcP190, corroborando com outros estudos. Foi encontrada uma variação no número de *reads* entre as espécies proximamente relacionadas, que pode ser explicada pela hipótese de biblioteca de DNAs repetitivos.

Os dados deste trabalho, representam uma estratégia inicial de busca por estas sequências em genomas, em especial na superfamília Hyloidea, antes da realização de ensaios de bancada e fornecem um modelo para verificar a presença de diferentes sequências nos genomas disponíveis.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. R. R. DE *et al.* Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.
- AMARO-GHILARDI, R. C. *et al.* Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): Localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetica**, v. 134, n. 2, p. 159–168, 2008.
- ÁVILA ROBLEDILLO, L. *et al.* Satellite DNA in *Vicia faba* is characterized by remarkable diversity in its sequence composition, association with centromeres, and replication timing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BALDISSERA, F. A.; LOPES DES OLIVEIRA, P. S.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (amphibia-anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genetica**, Soc Brasil Genetica, v. 16, n. 2, p. 335-345, 1993.
- BARBOSA, P. *et al.* Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 2006.
- BILINSKI, P. *et al.* Genomic abundance is not predictive of tandem repeat localization in grass genomes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–12, 2017.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415–420, 2015.
- BISCOTTI, M. A. *et al.* Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 463–477, 2015.
- BLACKBURN, E. Structure and function of telomeres. **Nature** **350**, 569–573, doi:10.1038/350569a0. 1991.
- BOLZÁN, A. D. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. Mutation Research - **Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 51–65, 2017.
- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. Mutation Research - **Reviews in Mutation Research**, v. 612, n. 3, p. 189–214, 2006.
- BRITTON-DAVIDIAN, J.; CAZAUX, B.; CATALAN, J. Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: Micro-evolutionary insights. **Heredity**, v. 108, n. 1, p. 68–74, 2012.
- BUSIN, C. S.; VINCIPROVA, G.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal rearrangements

as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica**, v. 110, n. 2, p. 131–141, 2000.

BUCKLER, E. S. et al. rAmpSeq: Using repetitive sequences for robust genotyping. **bioRxiv**, p. 096628, 2016.

CABRERO, J. et al. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosome Research**, v. 11, n. 4, p. 375–381, 2003.

CANEDO, C.; GARCIA, J. P.; POMBAL JR, J. P. Diet of *Pipa carvalhoi* (Amphibia, Pipidae) is not influenced by female parental care. **Herpetological Review**, v. 37, n. 1, p. 44–45, 2006.

CANNATELLA, D. C.; TRUEB, L. Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 94, n. 1, p. 1–38, 1988.

CERUTTI, F. et al. The major horse satellite DNA family is associated with centromere competence. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.

CHEW, J. S. K., OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; DOBSON, M.J. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG) n repetitive sequences in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**. 111: 45–52, 2002.

COELHO, A. C. et al. Intra-generic and interspecific karyotype patterns of *Leptodactylus* and *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with inclusion of five species from Central Amazonia. **Genetica**, v. 144, n. 1, p. 37–46, 2016.

CORRESP, S. M.; GRABHERR, M. First de-novo transcriptome assembly of a South American frog, *Oreobates cruralis*, enables population genomic studies of Neotropical amphibians. n. September, 2017.

CUEVAS P., C. C. A new species of the genus *Alsodes* (Anura: Neobatrachia) from the Nothofagus forest, Coastal Range, Southern Chile, identified by its karyotype. **Zootaxa**, n. 1771, p. 43–53, 2008.

CRISCIONE, S. W. et al. Transcriptional landscape of repetitive elements in normal and cancer human cells. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.

DE MATTOS, T. L. et al. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). **BMC Genetics**, v. 15, 2014.

DE SOUZA E SOUSA, J. F. et al. Evolutionary Relationships among *Boulengerella* Species (Ctenoluciidae, Characiformes): Genomic Organization of Repetitive DNAs and Highly Conserved Karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 152, n. 4, p. 194–203, 2017.

DOOLITTLE, W. F. Is junk DNA bunk? A critique of ENCODE. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 14, p. 5294–5300, 2013.

DUAN, Y. S. et al. Karyotypes and fish detection of 5s and 45s rdna loci in chinese medicinal plant *Atractylodes Lancea* subsp. *Luotianensis*: Cytological evidence for the new taxonomic unit. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 103–107, 2015.

EZAZ, T; DEAKIN, J.E. Repetitive sequence and sex chromosome evolution in vertebrates. **Adv. Evol Biol** 2014:1–9, 2014.

FELICIELLO, I.; PICARIELLO, O.; CHINALI, G. Intra-specific variability and unusual organization of the repetitive units in a satellite DNA from *Rana dalmatina*: Molecular evidence of a new mechanism of DNA repair acting on satellite DNA. **Gene**, v. 383, p. 81–92, 2006.

FERRO, J. M. et al. Chromosome evolution in *Cophomantini* (Amphibia, Anura, Hylineae). **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–29, 2018.

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequence of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell** 12: 1069– 1084. 1977.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: **an Online Reference**. American Museum of Natural History, New York. [ElectronicDatabase] <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> [Version 6.0 accessed 09. March 2020].

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, 2017.

GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2016.

GATTO, K. P. et al. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. August, p. 301, 2018.

GETLEKHA, N. et al. Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 203–211, 2016.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, v. 34, n. 5, p. 830-839, 1991.

GOLDSTEIN, D. B., ALLEN, A., KEEBLER J, et al. Sequencing studies in human genetics: design and interpretation. **Nat Rev Genet** 14(7):460-70, 2013.

GONZÁLEZ, J., PETROV, D.A. Evolution of genome content: population dynamics of transposable elements in flies and humans. **Methods in Molecular Biology**, v.855, p. 361-383, 2012.

GONZÁLEZ, M. L.; CHIAPELLA, J. O.; URDAMPILLETA, J. D. Characterization of some satellite DNA families in *Deschampsia antarctica* (Poaceae). **Polar Biology**, v. 41, n. 3, p. 457–468, 2018.

- GREEN, D.M.; Sessions, S.K.. Karyology and Cytogenetics. In: Amphibian Biology, Volume 7. Systematics. Heatwole H, Tyler M (Eds). Surrey Beatty and Sons, 2756-2841 pp, 2007.
- GREEN, D.M; SESSIONS, S.K Nomenclature for chromosomes. In Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego: **Academic Press**; 431–432. 1991, ed. 2012.
- GRUBER, S. L. *et al.* Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae). **BMC Genetics**, v. 13, p. 1–9, 2012.
- HE, Q. *et al.* Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Plant Biology*, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
- HICKMAN JR, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus* I: identification of chromosomes in *P. nigra* by fluorescent banding method. **Botanical Magazine of Tokyo**, Tokyo, v. 96, p. 273-276, 1983.
- HOLT, C.; YANDELL, M. MAKER2: An annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, 2011.
- IRISARRI, I. *et al.* Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.
- IWATA-OTSUBO, A. *et al.* Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)-Based Karyotyping Reveals Rapid Evolution of Centromeric and Subtelomeric Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) and Relatives. **Genetics Society of America**, v. 6, n. 4, p. 1013–1022, 2016.
- IZECKSOHN, E. Uma nova especie de *Pipa*, do estado do Amazonas, Brasil (Amphibia, Anura, Pipidae). **Rev. Brasil. Biol.** 36:507-510. 1976.
- JANSSEN, A.; COLMENARES, S.U.; KARPEN, G.H. Heterochromatin: guardian of the genome **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 34:265–288, 2018.
- JESUS, C. M. *et al.* Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25–32, 2003.
- KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. V.115, p49-63, 2002.
- KRETSCHMER, R. *et al.* Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine columbidae species (Aves, Columbiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 98–106, 2018.
- LEPESANT, J. M. J. *et al.* Combination of de novo assembly of massive sequencing reads with classical repeat prediction improves identification of repetitive sequences in *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 4, p. 470–474, 2012.

- LEK, M., KARCZEWSKI, K.J., MINIKEL, E.V., et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**; 536, 285–291, 2016.
- LIN, K. W.; YAN, J. Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 1–2, p. 95–110, 2008.
- LINNAEUS, C. Systema naturae. Editio decima, **reformata**. Stockholm 1:1-11, 1-824. 1758.
- LIU, T. *et al.* A Tandemly Arranged Pattern of Two 5S rDNA Arrays in *Amolops mantzorum* (Anura, Ranidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 151, n. 3, p. 161–170, 2017.
- MACAS, J.; NEUMANN, P.; NAVRÁTILOVÁ, A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–16, 2007.
- MARIANO, D. C. *et al.* MapRepeat: an approach for effective assembly of repetitive regions in prokaryotic genomes. **Bioinformatics**, v. 11, n. 6, p. 276–279, 2015.
- MAYER, C.; LEESE, F.; TOLLRIAN, R. Genome-wide analysis of tandem repeats in *Daphnia pulex* - a comparative approach. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- MEGYERI, M. *et al.* Cytomolecular discrimination of the Am chromosomes of *Triticum monococcum* and the A chromosomes of *Triticum aestivum* using microsatellite DNA repeats. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 1, p. 67–70, 2017.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet** 11(1):31- 46, 2010.
- MEZZASALMA, M. *et al.* Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 47–53, 2015.
- MILANI, D. *et al.* The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. Sobre uma collecção de vertebrados do nordeste brasileiro. Primeira parte: Peixes e batrachios. **O Campo**, v. 8, p. 54–56, 1937.
- MORESCALCHI, A. Karyology of the main groups of African frogs. *Monitore Zoologico Italiano*, **Supplemento**, v. 15, n. 1, p. 41–53, 1981.
- MULLER, L. On a new species of the genus *Pipa* from northern Brazil. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 14:102, 1914.
- MULLER. Neue oder seltene Reptilien und Ba-trachier der Zoologischen Sammlung der bayrischen Staates. **Zool. Anz.**, Leipzig 58:291-297, 1924.
- MURAKAMI, T. *et al.* Establishment of high-resolution FISH mapping system and its application for molecular cytogenetic characterization of chromosomes in newt, *Cynops*

- pyrrhogaster* (Urodela, Amphibia). **Chromosome Research**, v. 15, n. 4, p. 471–484, 2007.
- MRAVINAC, B.; PLOHL, M. Satellite DNA junctions identify the potential origin of new repetitive elements in the beetle *Tribolium madens*. **Gene**, 394, 45–52. 2007.
- NANDA, I.; FUGATE, M.; STEINLEIN, C.; SCHMID, M. Distribution of (TTAGGG) *n* telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenet Genome Res** 122:396– 400, 2008.
- NANDA, I. *et al.* Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chromosoma**, v. 101, n. 5–6, p. 301–310, 1992.
- NGUYEN, T. T. *et al.* Phylogenetic position of the saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) inferred from cytogenetic analysis of eleven species of Bovidae. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 41–54, 2008.
- NOVÁK, P. *et al.* RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p.1–12, 2010.
- NOWAK, R. M. Assembly of repetitive regions using next-generation sequencing data. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, v. 35, n. 4, p. 276–283, 2015.
- O’MEALLY, D. *et al.* Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. **Chromosome Research**, v. 18, n. 7, p. 787–800, 2010.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- PALAZZO, A. F.; GREGORY, T. R. The Case for Junk DNA. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 5, 2014.
- PARK, S.T., KIM, J. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J* 20(Suppl 2): S76-83, 2016.
- PEIXOTO, M.A. A., OLIVEIRA, M.P.C., FEIO, R.N., DERGAM J.Á. Karyological study of *Oloolygon tripui* (Loureço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. **CCG** 10:505-516, 2016.
- PEIXOTO, M. A. A. *et al.* The karyotypes of five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. **Genetica**, v. 143, n. 6, p. 729–739, 2015.
- PEREIRA, L. *et al.* Molecular Markers for Assessing Must Varietal Origin. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1252–1259, 2012.
- PETRACCIOLI, A. *et al.* A novel satellite DNA isolated in *Pecten jacobaeus* shows high

sequence similarity among molluscs. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 5, p. 1717–1725, 2015.

PFEUFFER-FRIEDERICH, I. Karyotypanalyse mit methodischen Vergleichen beider Wabenkröte *Pipa carvalhoi*. Universität Mainz, Diplomarbeit (**unpublished degree thesis**), 1980.

PIEDNOËL, M. et al. Next-generation sequencing reveals the impact of repetitive dna across phylogenetically closely related genomes of orobanchaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 11, p. 3601–3611, 2012.

PICARIELLO, O. et al. S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana Graeca graeca* and *Rana Graeca italica* are different species. **Genome**, v. 45, n. 1, p. 63–70, 2002.

PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 163–177, 2000.

PITA, S. et al. Comparative repeatome analysis on Triatoma infestans Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0181635, 2017.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, C. Satellite DNA Evolution. In: Garrido- Ramos MA, ed. **Repetitive DNA**. Basel: Karger, 126–152. 2012.

PONS, J.; BRUVO, B.; PETITPIERRE, E.; PLOHL, M.; UGARKOVIC, D.; JUAN, C. Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): Random differential amplification from a common ‘satellite DNA library’. **Heredity**, 92, 418–427, 2004.

PYRON, R.A., WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Mol. Phylogenet. Evol.** 61, 543–583, 2011.

RAMOS, E. et al. The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. **Chromosoma**, v. 126, n. 2, p. 313–323, 2017.

REHM, H.L. Evolving health care through personal genomics. **Nat Rev Genet** 18(4):259–267, 2017.

ROMERO, J. et al. Repetitive sequences in Eragrostis curvula cDNA EST libraries obtained from genotypes with different ploidy. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 1, p. 55–67, 2016.

RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, n. 3, p. 323–340, 2018.

RUIZ-RUANO, F. J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–14, 2016.

RUIZ-RUANO, F.J et al. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma** 124:221–234, 2015.

- RUTHVEN, A. G.; GAIGE, H. T. Description of a new species of *Pipa* from Venezuela. **Occasional Papers of the Museum of Zoology**. University of Michigan, v. 136, p. 1–2, 1923.
- SAID, M. *et al.* The Agropyron cristatum karyotype, chromosome structure and cross - genome homoeology as revealed by fluorescence in situ hybridization with tandem repeats and wheat single - gene probes. **Theoretical and Applied Genetics**, n. August, 2018.
- SAMOLUK, S. S. *et al.* Evolutionary dynamics of an at-rich satellite DNA and its contribution to karyotype differentiation in wild diploid *Arachis* species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, n. 2, p. 283–296, 2017.
- SANTOS, M. DA S. *et al.* Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. **Genetica**, v. 143, n. 5, p. 535–543, 2015.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C. Chromosome Banding in Amphibia. XXXVI. Multimorphic Sex Chromosomes and an Enigmatic Sex Determination in *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). **Cytogenet Genome Res**;154:86-98, 2018.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C. Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148, n. 2–3, p. 211–226, 2016.
- SCHMUTZER, T. *et al.* Kmasker - A tool for in silico prediction of single-copy FISH probes for the large-genome species *Hordeum vulgare*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 142, n. 1, p. 66–78, 2013.
- SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus Organizer Regions and Nucleoli. **Human Genetics** , New York, v. 63, p. 89-99, 1983.
- SESSION, A. M. *et al.* Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 336–343, 2016.
- SESSION, S.K; GREEN, D.M. Amphibian Cytogenetics and Evolution, **Academic Press**, (Eds.), San Diego, CaP 02. pp. 7-31.1991, eds 2012.
- SHARMA, S.; RAINA, S. N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1–3, p. 15–26, 2005.
- SHEARER, L. A. *et al.* Fluorescence In Situ Hybridization and Optical Mapping to Correct Scaffold Arrangement in the Tomato Genome. **Genetics Society of America**, v. 4, n. 8, p. 1395–1405, 2014.
- SHEN, T., LEE, A., SHEN, C., LIN, C.J. The long tail and rare disease research: the impact of next-generation sequencing for rare Mendelian disorders. **Genet Res** 14;97:e15, 2015.
- SHIRASAWA, K.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S. Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato. **DNA Research**, v. 23, n. 2, p. 145–153, 2016.

SILVA, M. J. et al. Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. 2020.

SIQUEIRA, S.; AGUIAR-JUNIOR, O.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal analysis of Brazilian “eleutherodactylinae” frogs (Amphibia: Anura), with suggestion of a new *Pristimantis* species. **Zootaxa**, v. 1860, p. 51–59, 2008.

SIQUEIRA, S. et al. The karyotype of three Brazilian *Terrarana* frogs (Amphibia, Anura) with evidence of a new *Barycholos* species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 470–476, 2009.

SOARES DE OLIVEIRA, I. et al. Comparative cytogenetic analysis of four species of *Dendropsophus* (Hylinae) from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Genetics**, v. 95, n. 2, p. 349–355, 2016.

SOBTI, R. C., OBE, G AND ATHWAL. R. C. Some aspects of chromosome structure and function. **Kluwer Academic Publishers**. New Delhi, India. P. 237, 2002.

STEUERNAGEL, B.; TAUDIEN, S.; GUNDLACH, H.; SEIDEL, M.; ARIYADASA, R. et al: De novo 454 sequencing of barcoded BAC pools for comprehensive gene survey and genome analysis in the complex genome of barley. **BMC Genomics** 10:547, 2009.

SUÁREZ, P. et al. Chromosome evolution in *dendropsophini* (amphibia, anura, hylinae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 4, p. 295–308, 2013.

SUDA, M. et al. Molecular cytogenetic characterization of telomere-specific repetitive DNA sequences in *Rana rugosa*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 315 A, n. 4, p. 222–231, 2011.

STROM, A., EMELYANOV, A., MIR, M. et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. **Nature** 547, 241–245, 2017.

TARGUETA, C. P. et al. Anuran cytogenetics: an overview. In: Naomi Norris & Carmen Miller. An Essential Guide to Cytogenetics. **Nova Science Publishers**, cap 1, p. 01-64., 2018.

TEIXEIRA, W.G.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; PINHAL, D.; POLETTO, A.B.; VENERE, P.C.; MARTINS, C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 125:224–234, 2009.

TORKAMANEH, D.; LAROCHE, J.; BELZILE, F. Genome-wide SNP calling from genotyping by sequencing (GBS) data: A comparison of seven pipelines and two sequencing technologies. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.

TRAN, T. D. et al. Centromere and telomere sequence alterations reflect the rapid genome evolution within the carnivorous plant genus *Genlisea*. **Plant Journal**, v. 84, n. 6, p. 1087– 1099, 2015.

TRUEB, L.; MASSEMIN, D. The osteology and relationships of *Pipa aspera* (Amphibia: Anura: Pipidae), with notes on its natural history in French Guiana. **Amphibia Reptilia**, v. 1, p.

33–54, 2000.

TRUEB, L.; CANNATELLA, D. C. Systematics, morphology, and phylogeny of genus *pipa* (ANURA: PIPIDAE). **Herpetologica**, v. 42, n. 4, p. 412–449, 1986.

TRUEB, L. Description of a New Species of *Pipa* (Anura:Pipidae) from Panama. **Herpetologica**, v. 40, n. 3, p. 225–234, 1984.

UNO, Y. et al. Molecular cytogenetic characterization of repetitive sequences comprising centromeric heterochromatin in three Anseriformes species. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–18, 2019.

UNO, Y. et al. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. **Chromosome Research**, v. 16, n. 7, p. 999–1011, 2008.

VAN NINWEGEN, K.J.M., VAN SOEST, R.A., VELTMAN, J.A., et al. Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost Analysis of Next-Generation Sequencing. **Clinical Chemistry** 62:11;1458–1464, 2016.

VENTURA, K.; SILVA, M.J.J.; FAGUNDES, V., CHRISTOFF, A.U.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG) n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). **Cytogenetics and genome research**. 115:169–17, 2006.

VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094–1116, 2010.

VITELLI, L. et al. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. **Chromosoma**, v. 84, p. 475–491, 1982.

VITTORAZZI, S. E. et al. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 101–107, 2011.

VITTORAZZI, S. E. et al. Comparative cytogenetics of *Physalaemus albifrons* and *Physalaemus cuvieri* species groups (Anura, Leptodactylidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 8, n. 2, p. 103–124, 2014.

VITTORAZZI, S. E. et al. Chromosomal analysis of *Physalaemus kroyeri* and *Physalaemus cicada* (Anura, Leptodactylidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 2, p. 311–323, 2016.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; LEITCH, A.R.; MCCANN, J.; JANG, T.S.; MACAS, J. Employing next generation sequencing to explore the repeat landscape of the plant genome. In Next Generation Sequencing in Plant Systematics *Regnum Vegetabile*; Hörandl, E., Appelhans, M., Eds.; **Koeltz Scientific Books: Königstein**, Germany, pp. 155–179. 2015.

WICKBOM, T. The chromosomes of *Pipa pipa*. **HEREDITAS** 36: 363–368. 1950.

XAVIER, C. et al. Insights into the karyotype evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae). **Chromosome Research**, p. 1–16, 2018.

XIANG, H.; LI, X. Q. Development of TBSPG Pipelines for Refining Unique Mapping and

Repetitive Sequence Detection Using the Two Halves of Each Illumina Sequence Read. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 1, p. 172–181, 2016.

YOU, F. M. et al. Annotation-based genome-wide SNP discovery in the large and complex *Aegilops tauschii* genome using next-generation sequencing without a reference genome sequence. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

ZADESENETS, K. S. et al. Comparative cytogenetics of opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae). **Parasitology International**, v. 61, n. 1, p. 87–89, 2012.

ZHANG, Y. et al. Chromosomal structures and repetitive sequences divergence in *Cucumis* species revealed by comparative cytogenetic mapping. **BMC Genomics**, v. 6,n., p.1–13, 2015.