

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DA ORDEM SULIFORMES

LUCIANO CESAR POZZOBON

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Coorientador: Rafael Kretschmer

Porto Alegre, RS

Novembro de 2023

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, constando com o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Também foram realizadas parcerias com o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR/UFRGS) e Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) para realização das coletas e do Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) para análise de dados.

“E a gente até balança, mas não cai”

Maresia – Rachel Reis

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre acreditou em mim. Principalmente minha mãe Jaciani, meu pai Luciano e meu irmão Ricardo. Vocês me deram amor, suporte, carinho e muita força. Obrigado por tudo. Amo vocês!

Ao Lucas, meu priminho, que esteve comigo durante toda minha infância e agora compartilhando bons momentos em Porto Alegre.

Aos colegas da Biologia Marinha, que levarei para toda a vida! Júlia, Maicon, Guilherme, Andrei, Marina, Thamara e Henrique que se fizeram presente mesmo com a vida de adulto criando empecilhos.

Ao Clube das Winx, que mesmo distante ainda torcemos um pelo outro. Principalmente a Júlia que me escutou inúmeras vezes.

À Maria Eduarda, minha prima e principalmente amiga. Mesmo distantes continuamos a nos apoiar e torcer um pelo outro. Te amo.

Aos meus colegas de laboratório, que me receberam com muito carinho. Em especial a Cris que me auxiliou a fazer o primeiro meio de cultura. A Binha e a Bruninha por cafés, conversas e ideias compartilhadas.

Um agradecimento especial aos meus orientadores, Thales R. O. de Freitas e Rafael Kretschmer. Que tiveram paciência para me ensinar citogenética, das técnicas clássicas até as moleculares.

Ao Luciano Silva, com toda sua paciência comigo no laboratório, sem sua ajuda não seria possível alcançar o nível que esta dissertação alcançou.

À Lúcia por todos auxílios e conversas.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Marina, Henrique, Anelise e Fernanda, pelos congressos, cafés, ideias e principalmente pelo suporte que damos uns aos outros.

Minhe namorade, Paulo. Por ser leve estar com você, pelo apoio que damos um ao outro, paciência, carinho e amor. Cada abraço teu me revigora quando eu mais preciso. Por isso e muito mais que eu te amo!

Obrigado a todos brasileiros que financiaram esta pesquisa e fazem com que seja possível a existência de um ensino gratuito e de qualidade.

Obrigado a todos que fizeram parte da minha trajetória e me auxiliaram até mesmo nos pequenos detalhes diários para que fosse possível a finalização desta dissertação.

A vida é coletiva e não fazemos nada sozinhos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Caracterização geral do cariótipo das aves.....	8
1.2 DNA satélite.....	10
1.3 Suliformes	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. CHAPTER I - KARYOTYPE EVOLUTION OF SULIFORMES AND DESCRIPTION OF MULTIPLE SEX CHROMOSOME SYSTEM IN THE GENUS <i>Sula</i>.....	16
4. CHAPTER II - SATELLITE DNA MAPPING IN WATERBIRDS (SULIFORMES): Reinforcing the Case for a Multiple Sex Chromosome System in Genus <i>Sula</i>.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
6. PRÓXIMOS PASSOS	19
7. COLABORAÇÕES	20
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

A ordem Suliformes engloba 61 espécies de aves aquáticas nas famílias Phalacrocoracidae, Anhingidae, Sulidae e Fregatidae. Até o momento, apenas 6 espécies tiveram seus cariótipos descritos, sendo cinco pertencentes à família Phalacrocoracidae e uma à família Sulidae. Entre essas, cinco espécies apresentam um número diploide inferior ao provável cariótipo ancestral das aves ($2n=80$), com a única exceção sendo *Microcarbo niger* ($2n=86$ e 90). DNAs satélite (satDNA) são sequências repetidas *in tandem* no genoma e envolvidas na evolução genômica. Por este motivo, o conhecimento sobre o satDNA e a sua localização é uma ferramenta útil para a compreensão da evolução e organização do genoma. Este estudo visa analisar a evolução cromossômica da ordem Suliformes por meio da caracterização cromossômica das espécies *Sula sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra* (Sulidae), *Nannopterum brasilianum* (Phalacrocoracidae) e *Fregata magnificens* (Fregatidae). A descrição das características do cariótipo foi realizada por coloração convencional com Giemsa, bandeamento C e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) com sondas de 18s rDNA, sequências teloméricas e de satDNAs. Os satDNAs foram identificados no software RepeatExplorer após o sequenciamento do genoma completo de machos e fêmeas de *S. leucogaster* e *N. brasilianum*. Seguido pela amplificação de satDNAs e, finalmente, FISH em cromossomos metafásicos de todas as espécies. O número diploide para *S. dactylatra* e *S. leucogaster* é $2n=76$ para machos, com cromossomos sexuais $Z_1Z_1Z_2Z_2$, e $2n=75$ para fêmeas, com cromossomos sexuais Z_1Z_2W . *S. sula* também apresenta $2n=76$ para machos. *N. brasilianum* tem um número diploide de $2n=74$, e *F. magnificens* tem um número diploide de $2n=76$. Todas espécies apresentaram um número diploide inferior ao provável cariótipo ancestral das aves. *N. brasilianum* exibiu quatro pares de cromossomos com cluster ribossomal, enquanto que as outras espécies apresentaram somente um par de microcromossomos com cluster ribossomal. Como o provável cariótipo ancestral possui um par de microcromossomos com cluster ribossomal, esses resultados indicam a ocorrência de eventos de transposição e amplificação em *N. brasilianum*. As sequências teloméricas exibiram sinais de hibridização diferentes nas cinco espécies estudadas, no geral, foi concomitante com blocos de heterocromatina constitutiva. Em relação ao satelitoma, cinco satDNAs foram identificados em *S. leucogaster* e oito em *N. brasilianum*. A distribuição do satelitoma esteve geralmente presente em regiões ricas em heterocromatina constitutiva, com exceções em *N. brasilianum*. Além disso, os sinais de hibridização de SleSat04 foi visível apenas no cromossomo W de *S. leucogaster*, e NbrSat07 apenas no cromossomo W de *N. brasilianum*. Ainda, os sinais de SleSat01 estiveram presentes no centrômero de todos os autossomos, mas nenhum sinal foi visualizado nos cromossomos Z_1 , Z_2 e W em *S. leucogaster*. Também, SleSat03 apresentou sinais para todos os microcromossomos de *S. dactylatra*, mas nenhum para o cromossomo Z_2 . Para o gênero *Sula*, é relatado um sistema de cromossomos sexuais múltiplos. A ausência de heterocromatina e satDNAs em Z_1 e Z_2 indica uma possível origem pela fissão do cromossomo Z ancestral. Em conclusão, os dados obtidos nesta pesquisa destacam eventos na evolução da ordem Suliformes. Ademais, a semelhança dos cromossomos sexuais é similar entre as famílias.

Palavras-chave: DNA satélite; Suliformes; Evolução; Sistema múltiplo de cromossomos sexuais.

ABSTRACT

The Suliformes order encompasses 61 species of waterbirds in the families Phalacrocoracidae, Anhingidae, Sulidae, and Fregatidae. Until now, only six species have their karyotype described, with five belonging to the Phalacrocoracidae family and one to the Sulidae family. Among these, five species have a diploid number lower than the putative ancestral avian karyotype ($2n=80$), with the only exception being *Microcarbo niger* ($2n=86$ and 90). Satellite DNAs (satDNA) are sequences repeated in tandem in the genome that are involved in the evolution of the genome organization. For this reason, the knowledge of satDNAs and their distribution on chromosomes can be a useful tool to comprehend the evolution of genome organization. This study aims to analyze the chromosomal evolution of the Suliformes order through the chromosomal characterization of *Sula sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra* (Sulidae), *Nannopterum brasilianum* (Phalacrocoracidae) and *Fregata magnificens* (Fregatidae). The karyotype characteristics were described by conventional staining with Giemsa, C-banding, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 18S rDNA, telomeric sequences, and satDNA probes. The satDNAs were identified in the software RepeatExplorer after the whole genome sequence of males and females of *S. leucogaster* and *N. brasilianum* and followed by amplification of satDNAs and, finally, FISH on metaphasic chromosomes from all species. The diploid number for the *S. dactylatra* and *S. leucogaster* is $2n=76$ for males, with $Z_1Z_1Z_2Z_2$ sex chromosomes and $2n=75$ for females, with Z_1Z_2W sex chromosomes. *S. sula* also has $2n=76$ for males. *N. brasilianum* has a diploid number of $2n=74$, and *F. magnificens* has a diploid number of $2n=76$. All species presented a diploid number lower than the putative ancestral avian karyotype. *N. brasilianum* showed four pairs of chromosomes with ribosomal clusters, while the other four species showed only one microchromosome pair with a ribosomal cluster. As the putative avian ancestral karyotype has one ribosomal cluster, these results indicate the occurrence of amplifications and transpositions in *N. brasilianum*. The telomeric sequence showed different hybridization signals in the five species studied, in general, they were concomitant with constitutive heterochromatin. In relation to the satellitome, five satDNAs were identified in *S. leucogaster* and eight in *N. brasilianum*. The distribution of the satellitome was generally present in the same region as the constitutive heterochromatin, with exceptions in *N. brasilianum*. Furthermore, the hybridization signal from SleSat04 was visible only on the W chromosome of *S. leucogaster* and from NbrSat07 only in the W chromosome of *N. brasilianum*. In addition, SleSat01 showed signs in the centromere of all autosomes but no signals for the Z_1 , Z_2 , and W chromosomes in *S. leucogaster*. Also, SleSat03 showed signals for all microchromosomes of *S. dactylatra* but none for the Z_2 chromosome. For the genus *Sula*, a multiple sex chromosome system is reported. The absence of heterochromatin and satDNAs in Z_1 and Z_2 indicates a possible origin by the fission of the ancestral Z chromosome. In conclusion, the data obtained in this research highlights events in the evolution of the Suliformes order. Moreover, the resemblance of the sex chromosomes is similar between the families.

Keywords: Satellite DNA; Evolution; Suliformes; Multiple sex chromosome system.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização geral do cariótipo das aves

O cariótipo das Aves foi descrito em somente 9,83% das espécies, sendo que a maioria apresenta em torno de 78 a 82 cromossomos, indicando uma estabilidade cariotípica (Ellegren 2013; Degrandi *et al.* 2020a). Entretanto, o número de cromossomos pode abranger de $2n=40$ em *Falco columbaris* a $2n=142$ em *Corythaixoides concolor* (Les Christidis 1990; Nishida *et al.* 2008). Uma característica do cariótipo das aves é a presença de dois grupos de cromossomos em relação ao tamanho, sendo classificados em macro e microcromossomos (Ellegren 2013). Um estudo comparativo entre a galinha (*Gallus gallus domesticus*) e o peru (*Meleagris gallopavo*) (Galliformes) demonstrou que os microcromossomos são mais ricos em guanina e citosina (GC) e possuem uma maior taxa de mutação (Axelsson *et al.* 2005). Além disso, os microcromossomos possuem uma maior densidade de genes (Waters *et al.* 2021).

Além do número cromossômico, a maioria das Aves apresentam como característica plesiomórfica um cluster ribossomal em um par de microcromossomos (Nishida-Umehara *et al.* 2007; Degrandi *et al.* 2020b). Aproximadamente 81% das aves apresentam o cluster ribossomal nos microcromossomos e 79,5% apresentam em somente um par de cromossomos (Degrandi *et al.* 2020b). Além disso, as aves da ordem Struthioniformes, consideradas mais basais, possuem um cluster ribossomal em um microcromossomo (Nishida-Umehara *et al.* 2007).

Os telômeros são sequências repetidas de DNA $(TTAGGG)_n$ no final dos cromossomos que mantém a estrutura destes e impedem a degeneração e perda de genes durante a replicação do DNA (Griffiths 2021). Nas Aves os telômeros podem chegar a ter 2Mb, sendo considerados mega telômeros (Delany *et al.* 2000; Nanda *et al.* 2002). A classificação dos telômeros nas aves de acordo com o tamanho foi realizada por Delaney *et al.* (2000) por meio da técnica de Restrição de Fragmentos Terminais (“Terminal Restriction Fragments” - TRF). A classificação do tamanho dos telômeros, de acordo com Delany *et al.* (2000), foi dividida em três classes: I) com comprimento de 0,5 a 10 Kb, II) de 10 a 40 Kb e III) de 40Kb a 2Mb. Ademais, a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) também permite visualizar diferenças no tamanho dos telômeros com sondas teloméricas hibridizadas com cromossomos metafásicos de acordo com a intensidade dos sinais observados. Em vista disto, Nanda *et al.* (2002) classificaram as sequências teloméricas nos microcromossomos em 1) sinais fortes no centrômero e fracos nos sítios teloméricos, 2)

igualmente fortes em ambos os sítios teloméricos e 3) microcromossomos cobertos por sondas teloméricas. As sequências teloméricas também estão presentes em regiões centroméricas e intersticiais em algumas espécies (Nanda *et al.* 2002). Estes sinais observados em regiões não teloméricas podem ser indicação de fusões cromossômicas ou da presença de DNA repetitivo com segmentos de DNA idênticos ao telômero (TTAGGG) (Nanda *et al.* 2002). A variabilidade telomérica também está presente na mesma espécie entre diferentes indivíduos e populações (Delany *et al.* 2003; Gangoso *et al.* 2021). Delany *et al.* (2003) demonstraram que vários machos de *Gallus gallus* apresentam diferentes padrões de telômeros de classe III. Já a nível populacional, Gangoso *et al.* (2021) demonstraram por meio de PCR quantitativa em tempo real que populações de *Gyps fulvus* possuem telômeros de diferentes tamanhos. As populações ao norte da Península Ibérica, que vivem em regiões antropizadas, possuem telômeros menores que as populações ao sul, região menos antropizada (Gangoso *et al.* 2021).

O sistema de determinação sexual das aves é por meio do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, na qual os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas são heterogaméticas (ZW) (Ellegren 2010). O cromossomo W é geralmente reduzido em tamanho em comparação ao cromossomo Z. Essa diferença é causada pela supressão da recombinação entre os cromossomos sexuais, que facilitam o acúmulo de DNA repetitivo e o surgimento de mutações deletérias, relaxando a seleção natural no cromossomo W e resultando em sua degeneração (Charlesworth *et al.* 2005; Ellegren 2013; Bellott *et al.* 2017; Charlesworth 2021). Entretanto, o acúmulo de DNA repetitivo no cromossomo W faz com que o mesmo apresente uma grande diversidade de morfologia e tamanho nas Aves (Rutkowska *et al.* 2012; Peona *et al.* 2021).

Nas Aves somente um caso de sistema múltiplo de cromossomos sexuais foi descrito até o momento, na espécie *Pygocelis adeliae* (Spheniscidae, Sphenisciformes) (Gunki *et al.* 2017). Neste caso, o número diploide para os machos é de $2n=96$, $Z_1Z_1Z_2Z_2$ e para as fêmeas é $2n=95$, Z_1Z_2W (Gunki *et al.* 2017). Gunki *et al.* (2017) observaram um bloco de heterocromatina constitutiva no cromossomo W e quase totalmente no cromossomo Z_2 , desta forma, postularam que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos em *P. adeliae* originou-se por meio de uma fusão em tandem entre o cromossomo W e um cromossomo autossômico no ancestral desta espécie. Apesar de somente um caso de cromossomos sexuais múltiplos ter sido registrado para as Aves, este sistema não é uma novidade. Em peixes, mamíferos, répteis e em gimnospermas já foram descritos sistema múltiplos sexuais com mais de uma

provável origem (Hizume *et al.* 1988; Rens *et al.* 2007; Steinberg *et al.* 2014; Pokorná *et al.* 2014; Gunski *et al.* 2017; Sember *et al.* 2021). Além da fusão do cromossomo sexual com um cromossomo autossômico, como o caso de *P. adeliae*, também pode ocorrer uma fissão que resultará no aumento do número diploide da espécie (Sember *et al.* 2021). Em peixes do gênero *Harttia*, três espécies (*H. villasboas*, *H. punctata* e *H. duriventris*) apresentam um sistema múltiplo sexual X_1X_2Y que teve como origem a fissão do cromossomo X (Sassi *et al.* 2023).

A heterocromatina constitutiva nas aves, visualizada por bandeamento C, é comumente observada nos centrômeros dos macrocromossomos, nos microcromossomos e cobre quase completamente o cromossomo W (Belterman & De Boer 1984; Kretschmer *et al.* 2014; Dos Santos *et al.* 2015; Schmid & Steinlein 2017). A heterocromatina constitutiva está correlacionada com DNA repetitivo, como elementos transponíveis e DNA satélite (Ruiz-Ruano *et al.* 2016).

1.2 DNA satélite

O genoma apresenta sequências repetidas em tandem chamadas de DNA satélite (satDNA), que podem ser classificados em minissatélites (<10pb repetidos até 1Kb), microssatélites (>10pb repetidos até 1Kb) e satélites (sequências repetidas até 100Mb) (Charlesworth *et al.* 1994; Garrido-Ramos 2017). Fry & Salser (1977) sugeriram a biblioteca de satélites, na qual os satélites surgem no ancestral comum e são compartilhados por um clado, mas com independência evolutiva entre as espécies. Esses satDNAs são agrupados em famílias por suas similaridades e podem variar na sequência de nucleotídeos, no número de cópias da sequência e na frequência no genoma (Ugarković & Plohl 2002; Šatović-Vukšić & Plohl 2023). Ruiz-Ruano *et al.* (2016) propuseram o termo satelitoma (*satellitome*) para definir os DNA satélites (satDNA) do genoma. Visto que satDNAs apresentam semelhanças e diferenças entre espécies relacionadas, o satelitoma se mostra uma ferramenta importante para estudar a evolução.

O DNA satélite MsaSat01-177 encontrado em peixes da família Characidae é um exemplo de evolução independente dos satélites em espécies próximas. Por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi visualizado dois sinais do satDNA MsaSat01-177 nas espécies *Hasemania kalunga* e *Astyanax bockmanni* e 36 sinais em *Moenkhausia sanctaefilomenae*. Entretanto, MsaSat01-177 é considerado uma relíquia em *Astyanax fasciatus*, isto, devido à sua baixa presença no genoma e ausência de sinais de hibridização nos cromossomos de *A.*

fasciatus (Utsunomia *et al.* 2017). As sequências de DNAs satélites em peixes também são indicativos da evolução independente entre os cromossomos sexuais. Em *Triporthus auritus* (Characiformes: Triporthidae), 15 satDNAs são específicos do cromossomo W e quatro estão presente em ambos cromossomos sexuais (Z e W), demonstrando a evolução independente dos cromossomos sexuais (Kretschmer *et al.* 2022). Ademais, dos 19 satDNAs de *Triporthus auritus* observado no cromossomo W, apenas quatro também estão presente no cromossomo W de *T. albus* e *T. signatus*, indicando uma origem no ancestral comum destas espécies (Kretschmer *et al.* 2022).

O satDNA também pode corroborar os estudos sobre evolução das espécies, como em Characoidae (Characiformes) que o satDNA CharSatr01-52 é consideravelmente conservado. Este satDNA esteve presente em 14 espécies da família Characoidae, sugerindo uma provável origem no ancestral em comum que viveu entre 140 a 78 milhões de anos atrás (dos Santos *et al.* 2021). Além de sua importância para uma melhor compreensão da evolução cromossômica das espécies, os DNA satélites são importantes na especiação, inibindo a segregação cromossômica em híbridos. Um exemplo disso é observado em *Drosophila* onde as fêmeas da prole do cruzamento entre fêmeas de *Drosophila simulans* e de machos de *D. melanogaster* não se desenvolvem em consequência do bloco satélite 359-pb (359-pb satellite block) (Ferree & Barbash 2009). A presença do bloco satélite 359-pb no cromossomo X de *D. melanogaster* e a sua respectiva ausência em *D. simulans* inibe a segregação cromossômica dos cromossomos X na fêmea híbrida (Ferree & Barbash 2009).

A transcrição dos satDNA são indicativos que possuem diversas funções além de estruturais. No besouro *Tribolium castaneum*, o DNAsat TCAST é transcrito após um longo estresse por calor, ocorrendo a repressão das histonas H3K9me2 e H3K9me3 na heterocromatina e na eucromatina, essa repressão está correlacionada com a supressão de genes próximos (Felicello *et al.* 2015). Dos Santos *et al.* (2021) demonstraram que o satDNA CharSatr01-52, sem função descrita, é transcrito em diferentes tecidos das espécies de peixe *Piaractus mesopotamicus*, *Astyanax paranae* e *Characidium gomesi*.

Os satDNAs nas aves são pouco estudados. Em Rheidae (Rheiformes), Strigidae (Struthioniformes), Corvidae e Paradisaeidae (Passeriformes) a maioria dos satDNAs identificados possuem uma porcentagem maior de citosina (C) e guanina (G) (Yamada *et al.* 2002; Yamada *et al.* 2004; Peona *et al.* 2023). Esta característica dos satDNAs das aves não corresponde aos satDNA identificados em outros táxons que possuem uma maior quantidade de adenina (A) e timina (T) (Lorite *et al.* 2004; Rojo *et al.* 2015; Crepaldi & Parise-Maltempi

2020; Da Silva *et al.* 2020; Sena *et al.* 2020). Em Corvidae e Paradisaeidae Peona *et al.* (2023) identificaram 61 famílias de satDNAs em 24 espécies. Para Corvidae os satDNA apresentaram uma maior divergência entre as espécies, enquanto que as espécies da família Paradisaeidae possuem uma frequência similar dos satDNA entre as espécies.

1.3 Suliformes

As ordens Phaethontiformes, Suliformes, Ciconiiformes e Pelecaniformes eram agrupadas na ordem Pelecaniformes até 2010 (Chesser *et al.* 2010; Mayr 2011). Com a possibilidade de estudos filogenéticos baseados em genes nucleares e mitocondriais foi possível identificar que se tratava de um grupo parafilético (Ericson *et al.* 2006; Hackett *et al.* 2008; Mayr 2011; Prum *et al.* 2015; Kuhl *et al.* 2021). As famílias Sulidae, Fregatidae, Anhingidae e Phalacrocoracidae foram realocadas para a ordem Suliformes, Phaethontidae para a ordem Phaethontiformes e Ciconiidae para Ciconiiformes (Chesser *et al.* 2010). Destas, Phaethontiformes não possui nenhuma espécie cariotípada (0/3), Suliformes é a segunda que menos apresenta estudos citogenéticos com apenas 9,8% (6/61) enquanto que Ciconiiformes tem 73,7% (14/19) e Pelecaniformes tem 29,7% (35/118) (Degrandi *et al.* 2020a).

Suliformes é dividida em quatro famílias, Fregatidae (fragatas), Sulidae (atobás), Phalacrocoracidae (cormorões) e Anhingidae (biguatinga) (Harrison *et al.* 2021). A família Sulidae é caracterizada por aves marinhas que são mergulhadoras e no Brasil são encontradas as espécies *S. sula* (Linnaeus, 1766) (atobá-de-pés-vermelhos), *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) (atobá-marrom) e *S. dactylatra* Lesson, 1831 (atobá-mascarado) (Fig. 1 A, B e C). Essas espécies são de médio porte, com diferentes colorações na plumagem. O dimorfismo sexual está presente nas espécies de atobá-marrom e atobá-mascarado. Nas populações de *S. leucogaster* do Atlântico os machos possuem a face amarela, anel do olho azulado e bico verde-acinzentado, já as fêmeas possuem o rosto amarelo com o bico rosado. Em *S. dactylatra* a fêmea é maior que o macho (Howell & Zufelt 2019). Nas regiões tropicais a disponibilidade de alimento é maior, e desta forma os atobás se reproduzem durante o ano todo (Krul 2004), outra característica deste gênero é a grande filopatria natal (Schreiber & Burger 2002).

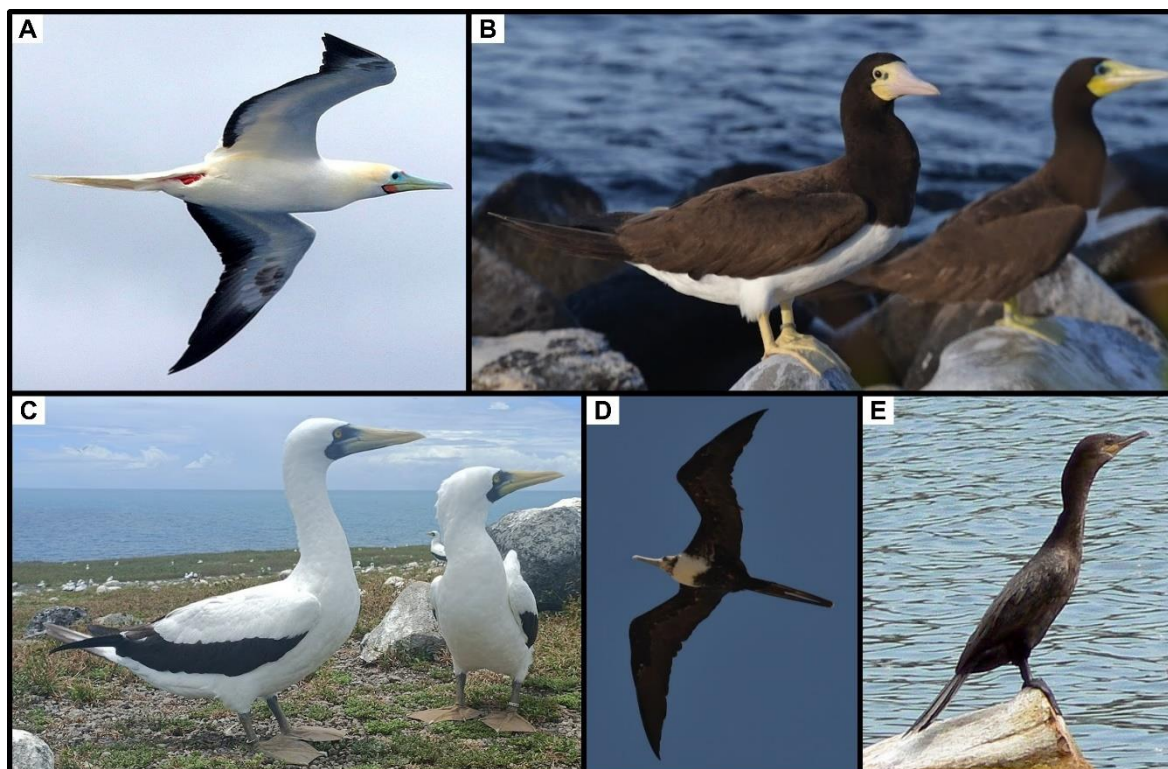


Figura 1- Espécies da ordem Suliformes. A) *Sula sula*, B) *S. leucogaster*, C) *S. dactylatra*, D) *Fregata magnificens* e E) *Nannopterum brasialinum*. Fonte: A e E licença comum; B, C e D disponibilizadas por Júlia Jacoby.

Nas aves marinhas o fluxo gênico é baixo devido aos fatores de isolamento geográfico, alta filopatria, fenologia de reprodução, distribuição de forrageamento, distribuição não-reprodutiva e diferenças no regime do oceano (Friesen 2015). Nas espécies do gênero *Sula* é notável o isolamento genético entre as populações. *Sula leucogaster* possui quatro grandes populações, sendo denominadas Mar Caribenho, Oceano Atlântico Central, Indo-Pacífico Central e Pacífico Leste (Morris-Pocock *et al.* 2011). Nunes & Bugoni (2018) demonstraram, utilizando nove microssatélites para descrever a diversidade genética, que as populações de *S. leucogaster* no Brasil apresentam isolamento genético por competição contra os imigrantes e por isolamento por diferenças ambientais. *Sula dactylatra* também apresentou isolamento genético na Ilha de Bedout (Austrália), provavelmente pela distância para com as outras colônias do Oceano Índico (Kingsley *et al.* 2020).

O gênero *Fregata* (Fregatidae) possui cinco espécies e quatro estão presentes no Brasil (*Fregata magnificens*, *F. minor*, *F. aquila* e *F. ariel*). Dentre as suas características comuns está a cauda comprida e bifurcada, longas asas estreitas e angulares e coloração predominante preta. Os machos diferem das fêmeas por apresentarem um saco vermelho inflável na garganta (Howell & Zufelt 2019). *Fregata magnificens* Mathews, 1914 (Fig. 1

D) consegue forragear grandes distâncias. Na meta população brasileira de *F. magnificens* é observado fluxo gênico entre as populações com origem sul em Moleques do Sul e norte em Abrolhos, entretanto as duas populações não trocam migrantes (Nuss *et al.* 2016).

Na família Sulidae somente *Morus bassanus* possui seu cariótipo descrito, apresentando 68 cromossomos (Belterman & De Boer 1984). Já na família Phalacrocoracidae cinco espécies já obtiveram o seu cariótipo descrito, sendo elas *Nannopterum brasilianum* com $2n=74$, *Phalacrocorax carbo* com $2n=62$, *Microcarbo pygmaeus* com $2n=70$, *M. niger* com $2n=86$ e *Leucocarbo bransfieldensis* com $2n=72$ (Theodorescu 1975; Patnaik *et al.* 1981; Belterman & De Boer 1984; Ledesma *et al.* 2005; Kretschmer *et al.* 2021). Totalizando seis espécies da ordem Suliformes com o cariótipo conhecido.

Nannopterum brasilianum (Gmelin, 1789) (biguá; Phalacrocoracidae; Fig. 1 E) é o cormorão mais abundante da América do Sul (Nelson 2005), entretanto não há dados sobre sua diversidade genética. Kretschmer *et al.* (2021) evidenciaram fissões e fusões entre os cromossomos do biguá em comparação com o cariótipo ancestral Neognathae (NGA). Nos pares homólogos aos cromossomos do ancestral NGA5 e NGA6 ocorreu fissão, enquanto que os cromossomos NGA5/7, NGA8/12, NGA9/10 e NGA 11/13 são fusionados (Kretschmer *et al.* 2021).

A descrição do cariótipo e do satelitoma são importantes para corroborar com o conhecimento sobre filogenia das espécies e compreender os mecanismos de especiação, bem como criar uma base de dados para posteriores estudos que utilizem os satélites das espécies estudadas. Para elucidar a evolução da ordem Suliformes, o presente trabalho pretende descrever os cariótipos de *Sula sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra* (Sulidae), *Nannopterum brasilianum* (Phalacrocoracidae) e *Fregata magnificens* (Fregatidae) e o satelitoma das espécies *S. leucogaster* e *N. brasilianum*, bem como investigar os processos evolutivos dos cromossomos comparando os cariótipos e o satelitoma entre as cinco espécies. O genoma das espécies *Sula leucogaster* e *Nannopterum brasilianum* será disponibilizado em bancos de dados públicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar a evolução cromossômica das espécies *Sula sula*, *S. leucogaster* e *S. dactylatra* (Sulidae), *Nannopterum brasilianum* (Phalacrocoracidae) e *Fregata magnificens* (Fregatidae) pertencentes a ordem Suliformes com foco na diferenciação dos cromossomos sexuais por meio da comparação interespecífica do cariótipo e do satelitoma.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o cariótipo de *S. sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra*, *N. brasilianum* e *F. magnificens*;
- Comparar o cariótipo das espécies *S. sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra*, *N. brasilianum* e *F. magnificens*;
- Realizar o sequenciamento de baixa cobertura do genoma de *S. leucogaster* e *N. brasilianum*;
- Caracterizar os DNA satélites no genoma de *S. leucogaster* e *N. brasilianum*;
- Comparar a localização cromossômica dos DNA satélites de *S. leucogaster* e *N. brasilianum* entre as tais e com *S. sula*, *S. dactylatra*, *N. brasilianum* e *F. magnificens*;
- Investigar a evolução cromossômica das espécies *S. sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra*, *N. brasilianum* e *F. magnificens*.

3. CHAPTER I

KARYOTYPE EVOLUTION OF SULIFORMES AND DESCRIPTION OF MULTIPLE SEX CHROMOSOME SYSTEM IN THE GENUS *Sula*

Luciano Cesar Pozzobon¹, Gustavo Akira Toma², Marcelo de Bello Cioffi², Rafael Kretschmer³, Thales Renato Ochotorena de Freitas¹

1 Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil

2 Laboratório de Citogenética de Peixes, Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 13565-905, SP, Brazil

3 Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, RS, Brazil

This article is being prepared for Genome [ISSN (Print): 0831-2796, ISSN (Electronic): 1480-3321, Impactor factor 3.1]

4. CHAPTER II

SATELLITE DNA MAPPING IN WATERBIRDS (SULIFORMES): Reinforcing the Case for a Multiple Sex Chromosome System in Genus *Sula*

Luciano Cesar Pozzobon¹, Ricardo Utsonomia², Marcelo de Bello Cioffi³, Rafael Kretschmer⁴, Thales Renato Ochotorena de Freitas¹

1 Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil

2 Faculdade de Ciências, Universidade Estadual de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

3 Laboratório de Citogenética de Peixes, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 13565-905, Brazil

4 Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-900, RS, Brazil

This article is being prepared for Genome [ISSN (Print): 0831-2796, ISSN (Electronic): 1480-3321, Impactor factor 3.1]

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises realizadas nas cinco espécies (*Sula sula*, *S. leucogaster*, *S. dactylatra*, *Nannopterum brasilianum* e *Fregata magnificens*) da ordem Suliformes por meio de citogenética clássica e molecular permitem concluir o seguinte:

- Através da análise cariotípica, heterocromatina constitutiva e localização de satDNAs, foi possível observar um sistema múltiplo de cromossomos sexuais no gênero *Sula*. Este sistema provavelmente originou-se por meio da fissão cêntrica do cromossomo Z. Neste caso os machos possuem $2n=76, Z_1Z_1Z_2Z_2$ e as fêmeas $2n=75, Z_1Z_2W$;
- Quatro espécies tiveram o cariótipo descrito pela primeira vez, sendo elas *Sula dactylatra* ($2n=75-76$), *S. leucogaster* ($2n=75-76$), *S. sula* ($2n=76$, somente macho) e *Fregata magnificens* ($2n=76$). A espécie *Nannopterum brasilianum* ($2n=74$) já havia seu cariótipo descrito e foi confirmado nesta dissertação;
- Por meio dos dados obtidos nesta pesquisa e nos dados disponíveis na literatura foi possível constatar eventos de reorganização cromossômica no cromossomo sexual Z da ordem Suliformes. Como o evento de fissão que gerou o sistema múltiplo de cromossomos sexuais no gênero *Sula*; e inversões na família Phalacrocoracidae;
- A maior porcentagem de guanina e citosina no satelitoma de *S. leucogaster* e *N. brasilianum*, juntamente com dados da literatura, confirma que esta é uma característica dos satDNAs das aves. Já que outros taxa apresentam uma porcentagem maior de adenina e timina.

6. PRÓXIMOS PASSOS

- Identificação de cluster ribossomal nas mesmas lâminas em que o SatSLE05 nas espécies *Sula dactylatra*, *S. leucogaster* e *S. sula* para complementação do capítulo II;
- Identificação de elementos transponíveis em *Nannopterum brasilianum* e *S. leucogaster*, bem como em possíveis genomas disponíveis em bancos de dados públicos;
- Hibridização dos satDNAs SleSat01 e SleSat03 em machos de *S. leucogaster* e *S. dactylatra*;
- Finalização e submissão dos artigos referentes aos capítulos desta dissertação.

7. COLABORAÇÕES

Artigo submetido:

Barcellos, Suziane Alves; Kretschmer, Rafael; de Souza, Marcelo Santo; Tura, Victoria; **Pozzobon, Luciano Cesar**; de Freitas, Thales Renato Ochotorena; Griffin, Darren K; Gunski, Ricardo José; Garnero, Analía del Valle. (2023) Understanding Microchromosome Organization in Four Representative Woodpeckers (Piciformes) through BAC-FISH Analysis. Genome.

Organização de evento:

Curso de Biologia Evolutiva 2023/01. Pereira, M. J. V. C. R.; Paludo, P.; Zani, A. L. S.; Figueiredo, P. I. C. C.; **Pozzobon, L. C.**; Almeida, B. M.; Regio, N. C.; Alexandre, B. G.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Axelsson E, Webster MT, Smith NGC, Burt DW e Ellegren H (2005) Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. *Genome Res* 15:120–125.

Bellott DW, Skaletsky H, Cho T-J, Brown L, Locke D, Chen N, Galkina S, Pyntikova T, Koutseva N, Graves T *et al.* (2017) Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nat Genet* 49:387–394.

Belterman RHR e De Boer LEM (1984) A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. *Genetica* 65:39–82.

Charlesworth B, Sniegowski P e Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220.

Charlesworth D (2021) When and how do sex-linked regions become sex chromosomes? *Evolution* 75:569–581.

Charlesworth D, Charlesworth B e Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128.

Chesser RT, Banks RC, Barker FK, Cicero C, Dunn JL, Kratter AW, Lovette IJ, Rasmussen PC, Remsen JV, Rising JD *et al.* (2010) Fifty-First Supplement to the American Ornithologists' Union *Check-List of North American Birds*. *The Auk* 127:726–744.

Crepaldi C e Parise-Maltempi PP (2020) Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. *Cytogenet Genome Res* 160:38–46.

Da Silva MJ, Fogarin Destro R, Gazoni T, Narimatsu H, Pereira Dos Santos PS, Haddad CFB e Parise-Maltempi PP (2020) Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. *Cytogenet Genome Res* 160:141–147.

Degrandi TM, Barcellos SA, Costa AL, Garnero ADV, Hass I e Gunski RJ (2020a) Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. *Cytogenet Genome Res* 160:199–205.

Degrandi TM, Gunski RJ, Garnero ADV, Oliveira EHCD, Kretschmer R, Souza MSD, Barcellos SA e Hass I (2020b) The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol* 43:e20180331.

Delany M, Daniels L, Swanberg S e Taylor H (2003) Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poultry Science* 82:917–926.

Delany ME, Krupkin AB e Miller MM (2000) Organization of telomere sequences in birds: evidence for arrays of extreme length and for in vivo shortening. *Cytogenet Genome Res* 90:139–145.

Dos Santos MDS, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Del Valle Garnero A, De Oliveira EHC e Gunski RJ (2015) Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica* 143:535–543.

dos Santos RZ, Calegari RM, Silva DMZ de A, Ruiz-Ruano FJ, Melo S, Oliveira C, Foresti F, Uliano-Silva M, Foresti FP e Utsunomia R (2021) A long-term conserved satellite DNA that remains unexpanded in several genomes of Characiformes fish is actively transcribed. *Genome Biol Evol* evab002.

Ellegren H (2013) The Evolutionary Genomics of Birds. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 44:239–259.

Ellegren H (2010) Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. *Trends Ecol Evol* 25:283–291.

Ericson PGP, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JI, Parsons TJ, Zuccon D e Mayr G (2006) Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biol Lett* 2:543–547.

Feliciello I, Akrap I e Ugarković Đ (2015) Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress. *PLoS Genet* 11:e1005466.

Ferree PM e Barbash DA (2009) Species-Specific Heterochromatin Prevents Mitotic Chromosome Segregation to Cause Hybrid Lethality in *Drosophila*. *PLoS Biol* 7:e1000234.

Friesen VL (2015) Speciation in seabirds: why are there so many species...and why aren't there more? *J Ornithol* 156:27–39.

Fry K e Salser W (1977) Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* 12:1069–1084.

Gangoso L, Cortés-Avizanda A, Sergiel A, Pudifoot B, Miranda F, Muñoz J, Delgado-González A, Moleón M, Sánchez-Zapata JA, Arrondo E *et al.* (2021) Avian scavengers living in anthropized landscapes have shorter telomeres and higher levels of glucocorticoid hormones. *Science of The Total Environment* 782:146920.

Garrido-Ramos M (2017) Satellite DNA: An Evolving Topic. *Genes* 8:230.

Griffiths AJF (2021) *Introdução a Genética*, 12th ed. Editora Guanabara Koogan Ltda, RIO DE JANEIRO, RJ

Gunski RJ, Delgado Cañedo A, Del Valle Garnero A, Ledesma MA, Coria N, Montalti D and Degrandi TM (2017) Multiple sex chromosome system in penguins (*Pygoscelis*, Spheniscidae). *CCG* 11:541–552.

Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han K-L, Harshman J *et al.* (2008) A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320:1763–1768.

Harrison P, Perrow MR e Larsson H (2021) Seabirds: the new identification guide, First edition. Lynx, Barcelona

Hizume M, Shiraishi H e Tanaka A (1988) A cytological study of *Podocarpus macrophyllus* with special reference to sex chromosomes. *Jpn J Genet* 63:418–423.

Howell SNG e Zufelt K (2019) Oceanic birds of the world: a photo guide. Princeton University Press, Princeton, NJ

Kingsley MR, Lavers JL, Steeves TE e Burridge CP (2020) Genetic distinctiveness of Masked Booby (*Sula dactylatra*) on Bedout Island, Western Australia. *Emu - Austral Ornithology* 120:150–155.

Kretschmer R, De Souza MS, Furo IDO, Romanov MN, Gunski RJ, Garnero ADV, De Freitas TRO, De Oliveira EHC, O'Connor RE e Griffin DK (2021) Interspecies Chromosome Mapping in Caprimulgiformes, Piciformes, Suliformes, and Trogoniformes (Aves): Cytogenomic Insight into Microchromosome Organization and Karyotype Evolution in Birds. *Cells* 10:826.

Kretschmer R, Goes CAG, Bertollo LAC, Ezaz T, Porto-Foresti F, Toma GA, Utsunomia R e de Bello Cioffi M (2022) Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). *Chromosoma* 131:29–45.

Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero ADV, Furo IDO, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA e De Oliveira EHC (2014) Molecular Cytogenetic Characterization of Multiple Intrachromosomal Rearrangements in Two Representatives of the Genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE* 9:e103338.

Kuhl H, Frankl-Vilches C, Bakker A, Mayr G, Nikolaus G, Boerno ST, Klages S, Timmermann B e Gahr M (2021) An Unbiased Molecular Approach Using 3'-UTRs Resolves the Avian Family-Level Tree of Life. *Molecular Biology and Evolution* 38:108–127.

Ledesma M, Cardozo D, Montalti C, Leotta G e Gunski RJ (2005) Estudios citogenéticos en tres especies de aves antárticas. *Revista De Ciencia Y Tecnología* 1:68–72.

Les Christidis (1990) 4: Chordata 3 B: Aves. Animal cytogenetics. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany, pp 20–59

Lorite P, Carrillo JA, Aguilar JA e Palomeque T (2004) Isolation and characterization of two families of satellite DNA with repetitive units of 135 bp and 2.5 kb in the ant *Monomorium subopacum* (Hymenoptera, Formicidae). *Cytogenet Genome Res* 105:83–92.

Mayr G (2011) Metaves, Mirandornithes, Strisores and other novelties - a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds: Higher-level phylogeny of birds. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49:58–76.

Morris-Pocock JA, Anderson DJ e Friesen VL (2011) Mechanisms of global diversification in the brown booby (*Sula leucogaster*) revealed by uniting statistical

phylogeographic and multilocus phylogenetic methods: MULTILOCUS PHYLOGEOGRAPHY OF BROWN BOOBIES. *Molecular Ecology* 20:2835–2850.

Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M e Schmid M (2002) Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111:215–227.

Nelson B (2005) Pelicans, cormorants and their relatives: Pelecanidae, Sulidae, Phalacrocoracidae, Anhingidae, Fregatidae, Phaethontidae. Oxford University Press, Oxford ; New York

Nishida C, Ishijima J, Kosaka A, Tanabe H, Habermann FA, Griffin DK e Matsuda Y (2008) Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Res* 16:171–181.

Nishida-Umehara C, Tsuda Y, Ishijima J, Ando J, Fujiwara A, Matsuda Y e Griffin DK (2007) The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Res* 15:721–734.

Nunes GT e Bugoni L (2018) Local adaptation drives population isolation in a tropical seabird. *Journal of Biogeography* 45:332–341.

Nuss A, Carlos CJ, Moreno IB e Fagundes NJR (2016) Population Genetic Structure of the Magnificent Frigatebird *Fregata magnificens* (Aves, Suliformes) Breeding Colonies in the Western Atlantic Ocean. *PLoS ONE* 11:e0149834.

Patnaik AK, Samanta M e Prasad R (1981) Chromosome complement and banding patterns in a pelecaniform bird, *Phalacrocorax niger*. *J Hered* 72:447–449.

Peona V, Kutschera VE, Blom MPK, Irestedt M e Suh A (2023) Satellite DNA evolution in Corvoidea inferred from short and long reads. *Molecular Ecology* 32:1288–1305.

Peona V, Palacios-Gimenez OM, Blommaert J, Liu J, Haryoko T, Jønsson KA, Irestedt M, Zhou Q, Jern P e Suh A (2021) The avian W chromosome is a refugium for endogenous retroviruses with likely effects on female-biased mutational load and genetic incompatibilities. *Phil Trans R Soc B* 376:20200186.

Pokorná M, Altmanová M e Kratochvíl L (2014) Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates. *Chromosome Res* 22:35–44.

Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM e Lemmon AR (2015) A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* 526:569–573.

Rens W, O'Brien PC, Grutzner F, Clarke O, Graphodatskaya D, Tsend-Ayush E, Trifonov VA, Skelton H, Wallis MC, Johnston S *et al.* (2007) The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol* 8:R243.

Royo V, Martínez-Lage A, Giovannotti M, González-Tizón AM, Cerioni PN, Barucchi VC, Galán P, Olmo E e Naveira H (2015) Evolutionary dynamics of two satellite DNA families in rock lizards of the genus *Iberolacerta* (Squamata, Lacertidae): different histories but common traits. *Chromosome Res* 23:441–461.

Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J e Camacho JPM (2016) High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep* 6:28333.

Rutkowska J, Lagisz M e Nakagawa S (2012) The long and the short of avian W chromosomes: no evidence for gradual W shortening. *Biol Lett* 8:636–638.

Sassi FDMC, Sember A, Deon GA, Liehr T, Padutsch N, Oyakawa OT, Vicari MR, Bertollo LAC, Moreira-Filho O e De Bello Cioffi M (2023) Homeology of sex chromosomes in Amazonian *Harttia* armored catfishes supports the X-fission hypothesis for the X1X2Y sex chromosome system origin. *Sci Rep* 13:15756.

Šatović-Vukšić E e Plohl M (2023) Satellite DNAs—From Localized to Highly Dispersed Genome Components. *Genes* 14:742.

Schmid M e Steinlein C (2017) The Hypermethylated Regions in Avian Chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 151:216–227.

Schreiber EA e Burger J (2002) *Biology of marine birds*. CRC Press, Boca Raton, Fla

Sember A, Nguyen P, Perez MF, Altmanová M, Ráb P e Cioffi MDB (2021) Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. *Phil Trans R Soc B* 376:20200098.

Sena RS, Heringer P, Valeri MP, Pereira VS, Kuhn GCS e Svartman M (2020) Identification and characterization of satellite DNAs in two-toed sloths of the genus *Choloepus* (Megalonychidae, Xenarthra). *Sci Rep* 10:19202.

Steinberg E, Nieves M e Mudry MD (2014) Multiple sex chromosome systems in howler monkeys (*Platyrrhini*, *Alouatta*). *CCG* 8:43–69.

Theodorescu RC (1975) The Karyotypic Evolution in Two Pelecaniformes Species (Aves). *Caryologia* 28:459–466.

Ugarković Đ and Plohl M (2002) Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *EMBO J* 21:5955–5959.

Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Silva DMZA, Serrano ÉA, Rosa IF, Scudeler PES, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM e Foresti F (2017) A Glimpse into the Satellite DNA Library in Characidae Fish (Teleostei, Characiformes). *Front Genet* 8:103.

Waters PD, Patel HR, Ruiz-Herrera A, Álvarez-González L, Lister NC, Simakov O, Ezaz T, Kaur P, Frere C, Grützner F *et al.* (2021) Microchromosomes are building blocks of bird, reptile, and mammal chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2112494118.

Yamada K, Nishida-Umehara C e Matsuda Y (2004) A new family of satellite DNA sequences as a major component of centromeric heterochromatin in owls (Strigiformes). *Chromosoma* 112:277–287.

Yamada K, Yamada K, Nishida-Umehara C e Matsuda Y (2002) Characterization and chromosomal distribution of novel satellite DNA sequences of the lesser rhea (*Pterocnemia pennata*) and the greater rhea (*Rhea americana*). *Chromosome Research* 10:513–523.