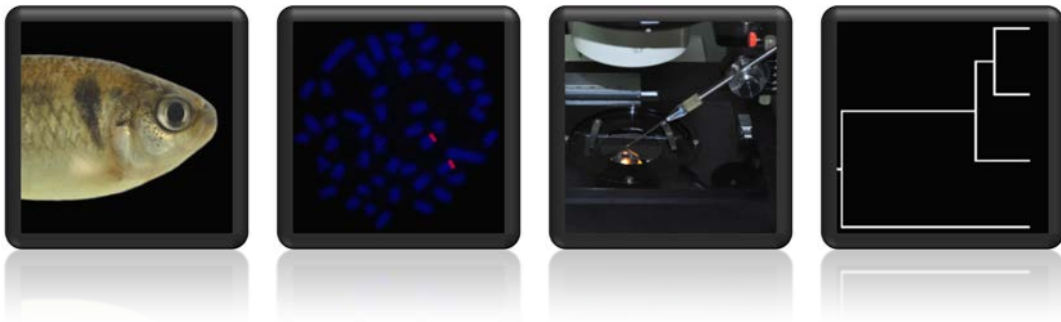


Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

**ESTRUTURA MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE
CROMOSSOMOS B EM *Astyanax paranae*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Mestrado



Botucatu, SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

ESTRUTURA MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE
CROMOSSOMOS B EM *Astyanax paranae*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-Orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do
Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Genética)

BOTUCATU, SP

2014

Se

(Rudyard Kipling, tradução de Guilherme Almeida)

Se fores capaz de manter a tua calma quando
Todo o mundo ao teu redor já a perdeu e te culpa;
De crer em ti quando estão todos duvidando,
E para esses, no entanto achar uma desculpa;
Se és capaz de esperar sem te desesperares,
Ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
E não parecer bom demais, nem pretensioso;

Se és capaz de pensar sem que a isso só te atires,
De sonhar sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se encontrando a desgraça e o triunfo conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas
Em armadilhas as verdades que disseste,
E as coisas, por que deste a vida, estraçalhadas,
E refazê-las com o bem pouco que te reste;

Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda a tua vida,
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
Resignado, tornar ao ponto de partida;
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persistir assim quando, exaustos, contudo
Resta vontade em ti que ainda ordena: "Persiste!";

Se fores capaz de, entre a plebe, não te corromperes
E, entre reis, não perder a naturalidade,
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
Se a todos podes ser de alguma utilidade,
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho,
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo
E o que mais, tu serás um homem, ó meu filho!

Dedico este trabalho à minha família

Agradecimentos

A Deus por me conceder a dádiva da vida, em seu mais amplo sentido.

A mãe natureza sem a qual nada existiria e por, apesar das nossas agressões, conservar-se exuberante onde pode, nos provendo o que necessitamos.

Ao professor Fausto Foresti, pela orientação, confiança e apoio recebidos ao longo desse tempo em seu laboratório.

Ao professor José Carlos Pansonato Alves, pela orientação, amizade, confiança e por me apoiar nos momentos mais difíceis da execução deste projeto.

Ao professor Cláudio de Oliveira, pela orientação e exemplo como pesquisador.

Aos colegas Ricardo Utsunomia e Cristian Araya, pela colaboração na execução de diversas partes deste trabalho, discussões e também pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial aos amigos do laboratório de citogenética, Priscila, Érica, Viviane, Maria Lígia e Cristiano, que ao longo desses anos tiveram muita paciência e dedicação comigo.

Ao técnico Renato Devidé pelo trabalho empenhado neste projeto, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório de Genética de Peixes da UNESP de Bauru, pela parceria no desenvolvimento deste projeto e amizade, em especial ao professor Fábio Porto Foresti e ao colega Sandro Natal Daniel.

Ao professor Diogo Teruo Hashimoto, pelas ideias e discussões que foram extremamente úteis na execução deste trabalho e também pela amizade.

Aos colegas da Universidade de Granada, em especial ao professor Juan Pedro Martínez Camacho e ao colega Francisco J. Ruíz Ruano, pelos ensinamentos, discussões e colaboração neste trabalho.

Ao Instituto de Biociências e à UNESP, pela minha formação como Biólogo.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e da seção técnica de Pós-Graduação que, através do seu trabalho, permitiram que este estudo fosse realizado.

A FAPESP, CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

A minha família, por tudo, mas principalmente por me permitir escolher e desenvolver meus projetos em um ambiente familiar de amor, carinho e respeito.

Aos meus amigos, por serem a família que eu escolhi.

A minha namorada Layane por seu companheirismo, paciência e amor.

Ao Grupo Escoteiro Padre Anchieta, por me permitir atuar na educação de jovens e com isso renovar minhas energias.

Aos amigos da academia Check-Mat de Jiu-Jitsu, por permitirem meu desenvolvimento nessa arte e extravasar minhas energias.

E a todas as outras pessoas com as quais eu tive o prazer de aprender durante a minha vida as coisas que me trouxeram até aqui. A cada professor, mestre, amigo, escritor, cientista, chefe escoteiro e outras pessoas que estiveram presentes em minha vida.

Resumo

Além dos cromossomos do complemento padrão A, alguns organismos possuem elementos genômicos extras chamados cromossomos B. Estes elementos enigmáticos estão presentes em aproximadamente 15% das espécies de eucariotos. Os mecanismos moleculares que norteiam o aparecimento e a evolução destes segmentos podem envolver silenciamento gênico, heterocromatinização, acúmulo de DNA repetitivo e transposons. O presente estudo se inseriu no programa de estudos de citogenética e genética molecular de peixes Neotropicais em desenvolvimento no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu, SP) e teve como objetivo o estudo da estrutura molecular e citogenética dos cromossomos B de *Astyanax paranae*. Análises citogenéticas clássicas e moleculares foram realizadas em exemplares desta espécie provenientes do rio Capivara, Bacia do rio Tietê (Botucatu-SP), revelando um número diploide padrão de $2n=50$ cromossomos ($8m+12sm+14st+16a$ e $NF=84$). Além disso, cromossomos supranumerários foram encontrados nas células de treze indivíduos (12 fêmeas e 1 macho) entre as 50 amostras analisadas, podendo se apresentar em duas variantes, uma metacêntrica (Bm) e uma submetacêntrica (Bsm). O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva principalmente na região terminal do braço longo dos cinco primeiros pares de cromossomos acrocêntricos e no cromossomo B. O mapeamento do DNAr 18S evidenciou sítios em alguns cromossomos A, além de estar presente em ambas as extremidades dos cromossomos supranumerários e nos pares 2 e 23. O DNAr 5S foi localizado na região pericentromérica dos cromossomos do par 2 e no braço curto dos cromossomos do par 20, estando ausente no cromossomo B. Sequências para as histonas H1, H3 e H4 foram observadas co-localizadas nos braços curtos dos cromossomos dos pares 2 e 23. Foram verificados sítios de histona H1 na região pericentromérica dos cromossomos Bm e Bsm. O elemento retrotransponível *Rex3* foi localizado nas regiões heterocromáticas dos cromossomos acrocêntricos. A

pintura cromossômica com sonda produzida a partir de apenas um dos braços do cromossomo Bm marcou ao longo de toda a extensão deste cromossomo e do cromossomo Bsm. A disposição das sequências de DNA repetitivo nos cromossomos Bm e Bsm, associada à grande homologia entre os braços destes cromossomos revelada pela pintura cromossômica, permitiu a inferência de que o cromossomo Bm desta espécie é um isocromossomo e que o cromossomo Bsm se originou a partir do cromossomo Bm pela ocorrência de uma inversão pericêntrica. Já o compartilhamento de sequências entre os cromossomos B e cromossomos específicos do complemento A (pares 2 e 23) indica que a origem dos elementos supranumerários pode estar relacionada a um desses pares autossômicos. A partir do DNA do cromossomo B microdissecado (μ B-DNA) foi realizada a amplificação e análise de sequências de histonas e do DNA ribossômico. Os resultados obtidos sugerem que a seleção purificadora estaria relaxada para as sequências de histona H1 presentes no cromossomo B. A análise de distância genética das sequências dos ITS revelou que as sequências do μ B-DNA apresentam maior similaridade com as sequências do gDNA de exemplares de *A. paranae* do que com sequências de gDNA de outras espécies próximas de *Astyanax*, indicando assim, que o μ B-DNA de *A. paranae* teve origem intraespecífica. A ocorrência tendenciosa de cromossomos B nas fêmeas de *A. paranae*, sugere que os cromossomos B desta espécie podem influenciar a determinação sexual. Conseqüentemente, é possível propor que os cromossomos 2 ou 23 (ancestrais ao B) podem corresponder a cromossomos sexuais em *A. paranae*. Os dados apresentados aqui permitiram um melhor entendimento dos processos envolvidos na origem e evolução dos cromossomos B em espécies do gênero *Astyanax*, sendo a análise das sequências que compõe este cromossomo em nível molecular uma importante ferramenta para a compreensão das relações entre os cromossomos B neste gênero.

Abstract

In addition to the standard complement of chromosomes A, some organisms have extra genomic elements called chromosomes B. These cryptic elements are present in approximately 15% of eukaryotic species. The molecular mechanisms that govern the evolution of these segments may involve gene silencing, heterochromatinization, accumulation of repetitive DNA and transposons. The present study was inserted in the general studies program of cytogenetics and molecular genetics of Neotropical fishes in development at the Laboratory of Biology and Genetics of Fishes (IBB/UNESP/Botucatu, SP) and aimed to study the molecular structure of B chromosomes and cytogenetics of *Astyanax paranae*. Classical and molecular cytogenetic analyzes were performed on specimens of this species from the Capivara River, Tietê River Basin (Botucatu-SP), revealing a pattern diploid number of this species of $2n=50$ chromosomes, with the karyotype formula identified by $8m+12sm+14st+16a$ and $FN=84$. Furthermore, supernumerary chromosomes found in the cells of thirteen samples (12 females and 1 male), and may appear in two variants, one metacentric (Bm) and a submetacentric (Bsm). The C-banding showed blocks of constitutive heterochromatin mainly in the terminal region of the long arm of the first five pairs of acrocentric chromosomes and in the B chromosome. The 18S rDNA mapping showed sites on some chromosomes, and be present on both ends of the supernumerary chromosomes and pairs 2 and 23. The 5S rDNA was located in the pericentromeric region of chromosome pair 2 and the short arm of chromosome pair 20, while absent on chromosome B. Sites for H1, H3 and H4 histones were observed co-located on the short arms of chromosomes pairs 2 and 23. Sites of histone H1 were observed in the pericentromeric region of chromosomes Bm and Bsm. The retrotransposable element *Rex3* was located in the heterochromatic regions of the

acrocentric chromosomes. The chromosome painting with probe generated from only one arm of chromosome Bm marked along the entire length of this chromosome and chromosome Bsm. The arrangement of the repetitive sequences of DNA in chromosomes Bm and Bsm, associated with extensive homology between the arms of these chromosomes revealed by chromosome painting, allowed to conclude that Bm chromosome is an isochromosome and that the Bsm chromosome originated from chromosome Bm by a pericentric inversion. Already, sharing threads among B chromosomes and specific chromosome complement A (2 and 23), allowed to draw a supernumerary origin of elements from one of these autosomal pairs. From the DNA of microdissected chromosome B (μ B-DNA), we amplified and analyzed sequences of histones and rDNA. The results suggest that purifying selection is relaxed for histone H1 sequences present on B chromosome. The genetic distance of the ITS sequences showed that the sequences of the μ B-DNA are more similar to the sequences of the 0B-gDNA of *A. paranae* than 0B-gDNA sequences of other closely related species of *Astyanax*, thus we conclude that the B-DNA of *A. paranae* had an intraspecific origin. A female-biased B chromosome presence in *A. paranae*, suggests that B chromosomes in this species influence sex determining. Consequently, it is possible to propose that chromosomes 2 or 23 (B ancestor) might correspond to sex chromosomes in *A. paranae*. The data presented here allow a better understanding of the processes involved in the origin and evolution of B chromosomes in the genus *Astyanax*, with an analysis of the sequences that make up this chromosome at the molecular level an important tool for understanding the relationships between the B chromosomes in this genus.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Cromossomos B	1
1.2. Cromossomos B em peixes	5
1.3. Microdissecção, microclonagem e pintura cromossômica	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Materiais	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Estimulação de mitoses	12
3.1.2. Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos	12
3.2.3. Coloração convencional com Giemsa	13
3.2.4. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs).....	14
3.2.5. Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C).....	14
3.2.6. Estudos Cariotípicos.....	15
3.2.7. Extração de DNA genômico.....	15
3.2.8. Caracterização das sequências de DNA	16
3.2.9. Produção de sondas para Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	17
3.2.10. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	17
3.2.11. Microdissecção Cromossômica.....	19
3.2.12. Amplificação (WGA4 – Sigma).....	20
3.2.13. Reamplificação e Marcação (WGA3 – Sigma).....	20
3.2.14. Isolamento e caracterização das sequências de DNA repetitivo presentes no cromossomo B.....	20
3.2.15. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	20
3.2.16. Clonagem	21
3.2.16.1. Crescimento e estocagem dos clones recombinantes	21
3.2.16.2. Extração do DNA plasmidial	21
3.2.16.3. PCR para confirmação da presença de insertos.....	21
3.2.17. Reação de sequenciamento.....	22
3.2.18. Análises moleculares.....	23
4. Resultados e Discussão	25
5. Considerações Finais	53
6. Referências	56

1. Introdução

1.1. Cromossomos B

Além dos cromossomos do complemento padrão A, alguns organismos possuem elementos genômicos extras chamados cromossomos B e estes elementos enigmáticos estão presentes em aproximadamente 15% das espécies de eucariotos. Estudos intensivos têm sido realizados atualmente em relação à possível função destes segmentos, incluindo desde a análise da sua distribuição nas espécies, passando por investigações sobre sua estrutura, origem, transmissão, dinâmica populacional, possíveis funções e evolução, até a integração destes cromossomos com os do conjunto genômico A. No entanto, o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular destes elementos ainda pode ser considerado bastante restrito (revisões em Camacho *et al.*, 2005; Bugrov *et al.*, 2007).

Os cromossomos B contêm principalmente sequências de DNA repetitivo, entre os quais o DNA ribossomal, centromérico e telomérico, além de elementos móveis (Camacho, 2005) e DNA organelar (Marques *et al.*, 2013). Fantinatti *et al.* (2011) mapearam diversos tipos de DNA repetitivo nos cromossomos de *Astatotilapia latifasciata*, sendo que no cromossomo B desta espécie foram identificados elementos transponíveis (TEs) *Rex1* e *Rex3* e sequências de DNAr 18S, enquanto que o elemento móvel *Rex6* e o DNAr 5S não foram observados neste cromossomo. Os autores sugerem que o retrotransposon *Rex6* poderia ter um comportamento dinâmico divergente dos outros TEs e que poderia ter sido perdido ou não transposto para o cromossomo B, ou ainda estar presente em um número de cópias não identificáveis pela técnica de FISH.

O compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre os cromossomos B e A caracteriza-se como uma situação já observada em diferentes organismos, como foi demonstrado em *Vulpes vulpes* (Yang *et al.*, 1999), *Apodemus peninsulae* (Rubtsov *et*

al., 2004), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2004), *P. kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2009a). Em alguns casos foram encontrados genes para proteínas em cromossomos B, como no fungo *Nectria haematococa* (Miao *et al.*, 1991), em espécies de Canídeos (Graphodatsky *et al.*, 2005; Yudkin *et al.*, 2007) e no gafanhoto *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010), indicando possível atividade gênica nestes cromossomos.

A primeira evidência de DNA repetitivo transcrito a partir de genes contidos em um cromossomo B foi fornecida por Leach *et al.* (2005) em *Crepis capillaris*. Nesta espécie foi detectado RNAr transcrito a partir do cromossomo B. A comparação de sequências entre os cromossomos A e B, incluindo comparações com espécies relacionadas, indicou que os genes para o RNAr do cromossomo B originaram-se dos cromossomos A. Utilizando uma metodologia semelhante à aplicada por Leach *et al.* (2005), Ruíz-Estévez *et al.* (2012) demonstram que o cromossomo B₂₄ de *Eyprepocnemis plorans* também possui DNAr ativo. O RNAr transcrito a partir do cromossomo B foi detectado através de RT-PCR utilizando-se *primers* complementares à região do ITS2. O *primer* reverso foi complementar a uma sequência de DNA exclusiva do cromossomo B com uma inserção diferencial de adenina que não está presente no ITS2 dos cromossomos A. Neste caso, a expressão do DNAr poderia contribuir para uma importante função do hospedeiro, como o aumento da produção de RNAr. Tal fato sugere que os cromossomos B podem não ser elementos geneticamente inertes como se pensava anteriormente e que podem conter genes codificantes cuja expressão pode interferir em importantes processos ontogenéticos como, por exemplo, determinação de sexo (Yoshida *et al.*, 2011).

Quanto à origem dos cromossomos B, as principais evidências apontam para processos intra ou interespecíficos (Camacho *et al.*, 2000; Perfectti e Werren, 2001;

Jones e Houben, 2003; Camacho *et al.*, 2005), porém a identificação correta do cromossomo ancestral constitui-se num desafio, uma vez que estes cromossomos extras possuem uma alta taxa de mutação e evolução independente (López-Léon *et al.*, 1993; Bakkali e Camacho, 2004).

Estudos envolvendo o mapeamento de sequências de DNA repetitivo em cromossomos B têm permitido inferências sobre a origem e possíveis processos de formação destes cromossomos (Maluszynka e Schweizer, 1989; Mestriner *et al.*, 2000; Dhar *et al.*, 2002; Teruel *et al.*, 2009a, b; Vicari *et al.*, 2011; Ruíz-Estévez *et al.*, 2012). No cromossomo B do peixe *Haplochromis obliquidens*, Poletto *et al.* (2010) mapearam sítios de DNAr 18S, permitindo inferir que este supranumerário pode ter origem a partir de segmentos genômicos da própria espécie. Já outra espécie de peixe, *Alburnus alburnus*, o retrotransposon Gypsy/Ty3 mapeado no macrocromossomo B não foi encontrado nos cromossomos do complemento A da espécie e nem em espécie relacionada, *Rutilus rutilus* (Ziegler *et al.*, 2003). Desta forma, os autores sugeriram que o cromossomo B de *A. alburnus* teve uma origem heteróloga e possui um caminho evolutivo próprio. Na espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata*, Bueno *et al.* (2013) revelaram a possível origem do cromossomo B através do mapeamento de sequências do U2 snDNA (small nuclear DNA) neste cromossomo e no cromossomo 1 do complemento A. Adicionalmente, os autores sugerem uma possível origem do supranumerário por isocromossomo, seguida de ampliação de um dos braços ou de uma inversão pericêntrica, tendo por base a distribuição simétrica dos sítios de U2 snDNA no cromossomo B e a diferença de tamanho dos seus braços.

A origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais também tem sido frequentemente postulada, principalmente em alguns gêneros de gafanhotos (Hewitt, 1979; Camacho, 2005). Comparações de sequências de DNA do anfíbio da

Nova Zelândia *Leiopelma hochstetteri* revelaram que o cromossomo B desta espécie deriva do cromossomo sexual W e que a homologia das sequências presentes nos cromossomos extras de populações geograficamente distantes indica uma origem única para este cromossomo B (Sharbel *et al.*, 1998).

Aplicando o mapeamento físico de BACs, Yoshida *et al.* (2011) sugeriram que o cromossomo B de ciclídeos do Lago Vitória derivou de cromossomos sexuais. A análise por FISH com a sonda B-BAC evidenciou sinais intensos no cromossomo 1 de *Lithochromis rubripinnis*, sugerindo ser este elemento do cariótipo um forte candidato para ancestral do cromossomo B nesta espécie. Por outro lado, o grupo de ligação LG3 corresponde ao cromossomo sexual em *Tilapia*, uma espécie relacionada aos ciclídeos do Lago Vitória e foi mapeado no cromossomo 1 destes ciclídeos, sugerindo que o cromossomo sexual de *Tilapia* corresponderia ao cromossomo 1 dos ciclídeos do Lago Vitória. Considera-se, pois, que o cromossomo B dos ciclídeos do Lago Vitória poderia ter evoluído a partir de uma parte do cromossomo 1 que contém genes de determinação sexual e finalmente ter adquirido esta função em algumas linhagens. Entretanto, não foram encontrados genes relacionados à determinação sexual nas sequências do B-BAC (Yoshida *et al.*, 2011).

Uma das características importantes dos cromossomos B é o seu comportamento durante a meiose em células germinativas, caracterizado pela ausência de pareamento com cromossomos do complemento A, bem como pela ocorrência de auto-pareamento (Mestriner *et al.*, 2000). Jones e Rees (1967) mostraram que a presença de cromossomos B na meiose de célula de centeio é capaz de influenciar a formação de quiasmas durante este processo de divisão celular, tanto em relação à frequência quanto na distribuição destas estruturas entre os braços dos cromossomos do complemento A. A ocorrência de não disjunção e migração preferencial para células

não degenerativas durante a formação das células germinativas faz com que esses cromossomos sejam infratores da lei mendeliana, alcançando taxas de transmissão superiores a 50%, mecanismo este responsável pelo seu acúmulo no genoma de algumas espécies (Camacho, 2000).

Análises realizadas em indivíduos da espécie de peixe *A. scabripinnis* por Salvador e Moreira-Filho (1992) permitiram sugerir que a frequência constante dos macrocromossomos B em 100% das células indicaria a existência de algum mecanismo de estabilização destes cromossomos no genoma. Em contraste, as variações inter e intra-individuais na frequência dos microcromossomos B nesta espécie poderiam ser atribuídas à irregularidade mitótica e meiótica destes elementos (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997). Em centeio, algumas variedades de cromossomos B foram identificadas, surgidas *de novo* através de autopolinização de uma planta portadora de dois cromossomos B. Devido à perda da região B-específica de controle da não-disjunção, a maioria das variedades geradas não era capaz de se acumular na população, não sendo encontradas nas populações naturais. A única variedade mitoticamente estável mostrou-se representada por um isocromossomo B de braços longos portador da região de controle da não-disjunção, surgido a partir do cromossomo B padrão da espécie e presente em indivíduos de diversas populações naturais (Marques *et al.*, 2012).

1.2. Cromossomos B em peixes

Em peixes, a ocorrência de cromossomos B já foi relatada em 38 espécies, entre cerca de 920 ou mais já cariotipadas (Oliveira *et al.*, 2009), mas a maioria destes estudos concentraram-se apenas na descrição da ocorrência e da frequência destes elementos genômicos extras nos indivíduos. Na maioria das espécies de peixes neotropicais os cromossomos B apresentam-se com tamanho reduzido ou como

microcromossomos; entretanto, cromossomos com diferentes tamanhos e morfologia já foram descritos, incluindo cromossomos grandes com tamanho aproximado ao do maior cromossomo das espécies (Oliveira *et al.*, 2009). Em sua maioria, os cromossomos B se identificam pela sua marcante quantidade de heterocromatina; porém, em *Moenkhausia sanctaefilomenae* são encontrados cromossomos B heterocromáticos e eucromáticos (Foresti *et al.*, 1989). Estes cromossomos extras podem estar presentes em números variados nas células dos organismos, sendo que em peixes existem relatos de um a nove cromossomos extras nas células de alguns indivíduos (Carvalho *et al.*, 2008).

Cromossomos B restritos ao sexo já foram relatados em dois casos em *Astyanax*. Em populações de espécies do complexo *A. scabripinnis* foram relatados cromossomos B restritos a fêmeas (Maistro *et al.*, 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997). De modo oposto, Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993) descreveram a presença de um microcromossomo B restrita aos indivíduos machos em uma população de *A. scabripinnis* do rio Jacu, sul do Brasil. Em outros estudos foram relatados cromossomos B associados a distorções na proporção sexual nas populações (Vicente *et al.*, 1996; Porto-Foresti *et al.*, 1997). Contudo, conclusões a respeito da restrição de cromossomos B a apenas um dos sexos podem estar sendo consideradas de forma precipitada, notadamente nos casos de estudos com tamanho amostral reduzido. Entretanto, a presença de cromossomos extras restritos a um dos sexos ou associados a razões sexuais distorcidas poderia indicar uma ligação dos B a mecanismos de determinação sexual, assim como descrito para peixes ciclídeos (Yoshida *et al.*, 2011).

A espécie *Astyanax paranae* Eigenmann, 1914, pertence ao complexo de espécies *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Bertaco e Lucena, 2006). Em geral, populações dessas espécies possuem cromossomos B em números diversos e com diferentes morfologias (Moreira-Filho *et al.*, 2004; Maistro *et al.*, 1999), sendo o caso mais comum a presença de um macrocromossomo B de tamanho semelhante ao do primeiro par de cromossomos

metacêntricos do complemento normal (Néo *et al.*, 2000). Em estudos realizados por Maistro *et al.* (1999) foi sugerido que o cromossomo B de *A. paranae* poderia ter surgido por não-disjunção envolvendo o primeiro par de cromossomos metacêntricos do complemento normal, gerando um elemento trissômico que teria seguido caminho evolutivo próprio, como proposto ocorrer em *A. scabripinnis* por Salvador e Moreira-Filho (1992); ou alternativamente, este elemento teria surgido pela amplificação de outros segmentos cromossômicos. Porém, dados mais recentes apontam para uma origem deste elemento genômico a partir de outro par cromossômico da espécie.

A partir de estudos meióticos, Mestriner *et al.* (2000) postularam que o cromossomo B de *A. scabripinnis* não segue herança do tipo mendeliano e se mostra como univalentes durante a meiose, podendo realizar auto-pareamento dos seus braços. Os autores mapearam um tipo de DNA satélite rico em A+T (59%) e com unidades monoméricas de 51bp, nomeado *As-51* no macrocromossomo B de *A. scabripinnis*. A localização deste DNA satélite em posições simétricas nos braços do cromossomo B e o auto-pareamento deste cromossomo durante a meiose permitiu a esses autores inferirem que este elemento genômico seria um isocromossomo. A formação deste cromossomo teria se dado durante divisão incorreta e pela não-disjunção das cromátides de um cromossomo acrocêntrico, provavelmente um dos homólogos do par 24 que contém sequências de DNA satélite *As-51*, corroborando a proposta de Vicente *et al.* (1996) adotada também por outros autores (Néo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2004). A origem intraespecífica do cromossomo B de *A. scabripinnis* a partir da formação de um isocromossomo foi confirmada por Vicari *et al.* (2011) com o uso de pintura cromossômica e aplicação de FISH utilizando sonda de DNA satélite *As-51* e *Cot-1*, sendo mostrado que o enriquecimento do novo cromossomo com as sequências de DNA repetitivo faria parte do processo de evolução dos elementos supranumerários nesta espécie.

1.3. Microdissecção, microclonagem e pintura cromossômica

A microdissecção cromossômica é uma técnica utilizada para o isolamento do DNA de regiões citogeneticamente conhecidas nos cromossomos com o uso de microagulhas ou laser. O material microdissectado é amplificado, constituindo uma biblioteca de fragmentos de DNA que representam o conteúdo da região de interesse e pode ser utilizada para diversas aplicações. No início da década de 90, a reamplificação dessas bibliotecas via PCR utilizando-se um *primer* degenerado (DOP-PCR – Degenerate oligonucleotide primed PCR) permitiu a construção de sondas para aplicação com o uso da metodologia de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), constituindo a técnica denominada micro-FISH (Meltzer *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 1992). A técnica de micro-FISH permite a localização de sequências específicas nos cromossomos, permitindo inferir a ocorrência de rearranjos e anormalidades cromossômicas, além de permitir a marcação com sondas de cromossomos inteiros, denominada pintura cromossômica (Trask, 1991). Em diversos grupos de organismos esta técnica tem sido utilizada na realização de estudos de evolução cromossômica (Bugrov *et al.*, 2003; Trifonov *et al.*, 2002; Marchal *et al.*, 2004; Henning *et al.*, 2008; Pazian *et al.*, 2013).

A técnica de microclonagem permite o estudo detalhado da composição de cromossomos específicos do genoma das espécies. Esta técnica, desenvolvida por Scalenghe *et al.* (1981), combina o uso da microdissecção cromossômica com a clonagem molecular. Contudo, na época de sua criação, este procedimento apresentava limitações relativas à quantidade de DNA isolado disponível para clonagem, uma vez que pequenas quantidades de DNA isoladas dificultavam a obtenção dos clones recombinantes. Com o aprimoramento da técnica algumas modificações foram feitas com o intuito de aperfeiçoar o processo de clonagem dos fragmentos obtidos (Pirrota *et*

al., 1983) e aumentar a quantidade de DNA isolado disponível (Saunders *et al.*, 1989; revisão em Zhou *et al.*, 2000). Assim, diversos autores aplicaram esta técnica no estudo da composição de cromossomos nos mais diferentes organismos (Henning *et al.*, 1983; Kao 1987; Sandery *et al.*, 1991, Huang *et al.*, 2004, dentre outros).

Com o advento de kits comerciais para amplificação do DNA isolado dos cromossomos, a quantidade de DNA utilizada na clonagem molecular passou a ser apropriada para a análise (revisão em Ahrabi *et al.*, 2010), sendo que atualmente o uso desses kits é essencial nos procedimentos de rotina em microclonagem. A amplificação do DNA cromossômico microdissectado por DOP-PCR ou WGA (Whole genome amplification) permite a construção de bibliotecas contendo grandes concentrações de DNA. A partir destas é possível realizar a clonagem aleatória de segmentos de DNA (Shotgun) (Jamilena *et al.*, 1995; Hizume *et al.*, 2001; Cheng e Lin, 2003) ou de sequências específicas isoladas por PCR utilizando-se *primers* específicos (Yoshida *et al.*, 2011; Serrano, 2013).

Considera-se, pois, que a aplicação de técnicas mais modernas de investigação na área da citogenética, como a microdissecção cromossômica e a pintura de cromossomos inteiros, neste caso, representado pelo cromossomo B microdissectado de *A. paranae*, possa resultar em informações que permitam uma melhor interpretação dos mecanismos envolvidos na origem e nas funções desempenhadas por estes elementos genômicos nesta espécie. Além disso, a utilização da técnica de hibridação fluorescente com sondas de segmentos específicos do genoma, além de permitir o mapeamento físico destes sítios, também deverá fornecer informações sobre a estrutura e dinâmica do processo evolutivo envolvendo estes elementos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho se inseriu no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IB/UNESP/Botucatu) e visou o melhor conhecimento da estrutura cromossômica das células eucariontes e em particular dos peixes, procurando conhecer os mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica, bem como os processos envolvendo a presença de cromossomos supranumerários nesse grupo de organismos.

2.2. Objetivos Específicos

Como já demonstrado, a espécie *Astyanax paranae* constitui um interessante modelo de estudo para a compreensão dos mecanismos citogenéticos e moleculares envolvidos na origem e composição dos cromossomos B no gênero *Astyanax*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos específicos:

a) ampliar os conhecimentos sobre a estrutura cromossômica neste grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de populações de *A. paranae* que apresentam cromossomos B;

b) analisar a distribuição de sequências de DNA repetitivo ribossomal, de histonas e retroelementos nos cromossomos do complemento A de *A. paranae* através de mapeamento físico, bem como investigar a presença destes DNAs no cromossomo B desta espécie;

c) traçar uma possível origem do cromossomo B a partir de cromossomos do complemento A da espécie com base na identificação de sequências de DNA presentes no cromossomo B;

d) identificar os mecanismos que norteiam a evolução das sequências identificadas no cromossomo B, através do isolamento e análise molecular destas sequências.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Foram coletados 50 indivíduos (32 fêmeas e 18 machos) de uma população de *A. paranae* do rio Capivara, bacia do rio Tietê (Botucatu, 22° 53' 57" S / 48° 23' 11" W). Nesta mesma localidade foram coletados indivíduos das espécies *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* que foram utilizados nos estudos de análise molecular.



Exemplar de *A. paranae* coletado no rio Capivara, Botucatu, São Paulo.

3.2. Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti *et al.*, 1981), marcação das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizado o método de pintura cromossômica utilizando sonda produzida a partir dos cromossomos Bs microdissecados, bem como a localização por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) de sequências de DNAr 18S e 5S, dos genes das histonas H1, H3 e H4 e dos elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3*.

Foi realizada a clonagem, sequenciamento e análise das sequências para o DNAr 18S, ITS1 e ITS2 e histonas H1 e H3 a partir do DNA genômico total de indivíduos sem B e do cromossomo B microdissecado, conforme especificado abaixo.

3.2.1. Estimulação de mitoses

Com o objetivo de se obter uma maior frequência de células em divisão mitótica nas preparações, os animais foram submetidos à injeção prévia de solução de fermento biológico, conforme descrito por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Bertollo *et al.* (1978) e Oliveira *et al.* (1988) para peixes, sendo que o procedimento utilizado consiste em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção:
0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37 °C) por cerca de 10 minutos;
- 3) injetar a solução na região dorso-lateral do peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado por cerca de 48 horas antes de sacrificar.

3.1.2. Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos

Para obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica proposta por Foresti *et al.* (1981), com algumas adaptações. Esta metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão por solução de KCl e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento utilizado consistiu em:

- 1) injetar solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal na região intra-abdominal;
- 2) manter o peixe em aquário bem aerado por um período de 50 minutos;

- 3) sacrificar o animal, retirando a porção anterior do rim e transferir o material para uma placa de Petri contendo 7 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de aspiração suave por uma pipeta Pasteur, até obter uma suspensão homogênea de tecido;
- 5) transferir a suspensão de células obtida para um tubo de centrífuga e deixa-lo no interior de uma estufa a 37 °C por 20 min;
- 6) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min a temperatura ambiente;
- 7) adicionar cerca de 8 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga a 1000 rpm por 10 min;
- 8) descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador; centrifugar por 10 min a 1000 rpm;
- 9) repetir o passo anterior por 2 vezes;
- 10) descartar o sobrenadante e diluir o precipitado em aproximadamente 1 ml de fixador (metanol e ácido acético);
- 11) pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar.

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

3.2.3. Coloração convencional com Giemsa

As preparações cromossômicas depositadas nas lâminas foram coradas por 5 minutos com solução de Giemsa a 5 % em tampão Fosfato (pH=6,7).

3.2.4. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs)

Para identificar as RONS foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de Prata descrita por Howell e Black (1980), com algumas adaptações. Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas ácidas que compõem o complexo protéico nas regiões organizadoras de nucléolos. O procedimento envolveu o uso de duas soluções:

- **Solução A** (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada. Adiciona-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- **Solução B** (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Estas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4 °C.

Procedeu-se da seguinte maneira:

- 1) hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60 °C;
- 2) lavar em água destilada e secar a lâmina;
- 3) misturar em um tubo *Eppendorf* três gotas da solução A e seis gotas da solução B com o auxílio de pipetas Pasteur;
- 4) pingar 6 gotas da mistura sobre a lâmina e cobrir com uma lamínula;
- 5) depositar a lâmina em um suporte no interior de um banho-maria a 65 °C com a lamínula voltada para baixo. Em aproximadamente 2 minutos a lâmina torna-se marrom-dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar.
- 6) corar com solução de Giemsa 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por 10 segundos;
- 7) lavar o material da lâmina e deixar secar ao ar.

3.2.5. Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita originalmente por Sumner (1972). Esta técnica baseia-se na ação sequencial de tratamentos com base, ácido e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico,

permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, que se encontram mais compactadas. O procedimento consistiu em:

- 1) secar as lâminas recém pingadas ao ar por uma noite;
- 2) hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
- 3) passar por solução de Ba(OH)₂ a 60 °C por cerca de 12 segundos e lavar em água destilada;
- 4) lavar em HCl 1N a 60 °C e, em seguida, em água destilada;
- 5) incubar por 30 minutos em 2xSSC (pH = 6,8) a 60 °C;
- 6) corar por 8 minutos com solução de Giemsa a 5% em tampão Fosfato (pH = 6,7).
Lavar e deixar secar ao ar.

3.2.6. Estudos Cariotípicos

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens das metáfases foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 softwares (Media Cybernetics).

Os cromossomos das imagens capturadas foram arranjados por ordem de tamanho, de acordo com a classificação como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) estabelecida por Levan *et al.* (1964), emparelhados com seus prováveis homólogos e organizados em ordem decrescente de tamanho para a disposição final do cariótipo.

3.2.7. Extração de DNA genômico

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

3.2.8. Caracterização das sequências de DNA

Sequências para os DNAr 5S e 18S, ITS, histonas H1, H3 e H4 e elementos móveis *Rex1* e *Rex3* foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de exemplares de *A. paranae* e do cromossomo B microdissecado. Foram utilizados os *primers* relacionados na Tabela 1 abaixo:

<i>Primer</i>	Sequência	T °C	Referência
18SF	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	56	White <i>et al.</i> , 1990
18SR	5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'		
5SF	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	55	Pendás <i>et al.</i> , 1994
5SR	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3'		
H1F	5'-ATGGCAGAARYCGMCCAG-3'	54	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011
H1R	5'- TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3'		
H3F	5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3'	54	Colgan <i>et al.</i> , 1998
H3R	5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3'		
H4F	5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3'	58	Pineau <i>et al.</i> , 2005
H4R	5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3'		
Rex1F	5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3'	55	Volff <i>et al.</i> , 2000
Rex1R	5'-TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC-3'		
Rex3F	5'-CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG-3'	55	Volff <i>et al.</i> , 1999
Rex3R	5'-TGGCAGACNNGGGTGGTGGT-3'		
ITSF	5'-GTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3'	54	Montoya-Burgos, 2003
ITSR	5'-TACCGGCCTCACACCGTCC-3'		

Tabela 1 Relação dos *primers* utilizados nas ampliações por PCR.

Reações de PCR.

As sequências analisadas foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Astyanax paranae* usando os *primers* relacionados na Tabela 1. Para as confirmações taxonômicas do material coletado, foi realizada a técnica do DNA

barcoding pela amplificação de uma sequência parcial do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I (COI), utilizando os primers FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward *et al.*, 2005).

As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µL de *Taq* DNA tampão (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,5 U de *Taq* polymerase (Invitrogen), 0,1 µM de cada *primer* e 50 ng de DNA genômico, utilizando-se o seguinte programa, com pequenas modificações específicas para cada gene:

95 °C ---- 5 min	} 31x
95 °C ---- 1 min	
54 °C ---- 45 seg	
72 °C ---- 1 min	
72 °C ---- 10 min	
12 °C ---- manutenção	

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

3.2.9. Produção de sondas para Hibridação *in situ* Fluorescente

As sondas de DNAr 5S, 18S, Histonas H1, H3 e H4 e dos elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* foram marcadas por PCR, sendo incluído na reação de amplificação o nucleotídeo digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) ou biotina-16-dUTP (Roche Applied Science).

3.2.10. Hibridação *in situ* Fluorescente

O mapeamento das sondas em cromossomos metafásicos foi realizado com a utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações conforme descrito a seguir:

- **Etapa 1: Preparação das lâminas**

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM por 10 minutos a 37 °C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho. Após a secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70% a 70 °C por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrano, 50% formamida e 20xSSC e Água) contendo 2 µL de sonda marcada por 10 minutos a 95 °C. Posteriormente, 30 µL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37 °C *overnight*.

- **Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes**

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42 °C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60 °C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de

solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxirodamina) por 1 hora em câmara úmida e no escuro a 37 °C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 15 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.2.11. Microdissecção Cromossômica

Para a técnica de pintura cromossômica foram microdissecados o cromossomo Bsm completo e um braço do cromossomo Bm (a fim de testar a hipótese de isocromossomo). Além disso, foi microdissecado o cromossomo Bm completo para o isolamento de sequências presentes neste cromossomo. Os procedimentos para a microdissecção cromossômica consistiram em diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1, respectivamente); pingar a suspensão em lamínulas grandes; secar o material ao ar e corar com solução Giemsa diluída a 5% em tampão Fosfato (KH_2PO_4 0,06M e Na_2HPO_4 0,449M, pH 6.8) durante 3 a 5 minutos. Lavar, então, as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar; depositar a lamínula contendo a preparação celular na platina de um microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder à microdissecção dos cromossomos com o auxílio de agulha de vidro fixada em um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Após este procedimento, depositar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR contendo solução de suspensão.

3.2.12. Amplificação (WGA4 – Sigma)

A amplificação do DNA do material microdissecado foi feita segundo o método GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (WGA4-Sigma) (Gribble *et al.*, 2004).

3.2.13. Reamplificação e Marcação (WGA3 – Sigma)

Os DNAs amplificados pelo método WGA4 (Sigma) foram marcados utilizando o kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification Kit (WGA3-Sigma), incluindo na reação o nucleotídeo digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science), de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação. Assim, foram geradas duas sondas, uma a partir do cromossomo Bsm completo e outra a partir de um braço do cromossomo Bm.

3.2.14. Isolamento e caracterização das sequências de DNA repetitivo presentes no cromossomo B

Utilizando-se o DNA do cromossomo Bm como molde, foram realizadas reações de PCR seguindo os parâmetros descritos anteriormente para isolar sequências de DNA repetitivo. Foram realizadas tentativas de amplificação de diversos tipos de DNA, no entanto, foi possível somente isolar sequências do DNAr 18S, ITS e histonas H1 e H3. Os fragmentos obtidos a partir destas reações foram analisados em gel de agarose e purificados para clonagem.

3.2.15. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Os fragmentos de interesse foram recortados do gel de agarose e purificados usando o Kit GE-PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.16. Clonagem

Os fragmentos de DNA purificados foram clonados com o kit TOPO TA (Invitrogen). O protocolo consistiu em:

- 1) *Ligação*: misturar 1 µl de vetor (plasmídeo pCR2.1TOPO), 1 µl de solução salina e 5 µl do fragmento purificado. Incubar por 25 minutos a temperatura ambiente. Colocar no gelo.
- 2) *Transformação*: misturar 2 a 4 µl da reação de ligação com 50 µl de células DH5α (cepa de *Escherichia coli* quimicamente competente) em um tubo de 1,5ml. Manter em gelo durante 30 minutos.
- 3) Aplicar um choque térmico a 42 °C por 40 segundos e colocar o tubo em gelo.
- 4) Acrescentar 250 µl de meio SOC em temperatura ambiente. Deixar as células crescerem sob agitação a 37 °C por uma hora e trinta minutos.

3.2.16.1. Crescimento e estocagem dos clones recombinantes

As bactérias transformadas foram transferidas para placas de Petri em meio LB/Agar contendo kanamicina, X-gal e IPTG. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*. As colônias recombinantes (brancas) foram retiradas com ponteiras estéreis e inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo kanamicina e incubadas *overnight* sob agitação.

3.2.16.2. Extração do DNA plasmidial

Para extração do DNA do plasmídeo foi utilizado o Kit Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System de acordo com instruções do fabricante.

3.2.16.3. PCR para confirmação da presença de insertos

O DNA plasmidial foi submetido a reações de amplificação por PCR com o uso dos *primers* M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13R (5'-

AGGAAACAGCTATGAC-3'). As reações foram realizadas com volume final de 25 μ L, com 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl₂, 1 μ L de *Taq* DNA tampão (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,5 U de *Taq* polymerase (Invitrogen), 0,1 μ M de cada *primer* e 50 ng de DNA plasmidial. O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

94 °C ---- 2 min	
94 °C ---- 1 min	} 25x
55 °C ---- 1 min	
72 °C ---- 1 min	
72 °C ---- 7 min	
12 °C ---- manutenção	

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

3.2.17. Reação de sequenciamento

O sequenciamento nucleotídico foi realizado utilizando o kit BIG DYE Terminator k.3.1 (Applied Biosystems), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Para cada amostra foi preparada a seguinte reação: 2 μ l de pré-mix (kit), 1 μ l de *primer* (3,3 mM), 40-100ng DNA (volume máximo de 5 μ l), água estéril (volume necessário para 10 μ l de reação final).

O programa de PCR de sequenciamento consistiu de uma etapa inicial de 2 minutos a 96 °C, seguida de 36 ciclos de 45 segundos a 96 °C, 30 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C, e de uma etapa final a 4°C.

Os produtos dessa reação foram purificados para eliminação de nucleotídeos terminadores não incorporados, de acordo com o seguinte procedimento: adicionar 2 μ l de acetato de sódio 3M e 80 μ l de etanol 95% em temperatura ambiente em cada tubo contendo o produto da reação de PCR de sequenciamento. Misturar no vortex e

centrifugar a 20°C por 30 minutos a 14000g. Remover cuidadosamente o sobrenadante por aspiração. Adicionar 400 µl de etanol 70% em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar a 20 °C por 5 minutos a 14.000g. Descartar cuidadosamente o sobrenadante por aspiração e deixar o *pellet* secar por uma hora em temperatura ambiente protegido da luz. O *pellet* poderá ficar guardado por um período de até um mês a 4°C protegido da luz. Ressuspender o *pellet* em 4 µl de tampão de carregamento (Formamida: blue Dextran, na proporção de 5:2). Passar os tubos pelo vortex, desnaturar as amostras por 5 minutos a 95 °C e colocá-las imediatamente no gelo após a desnaturação. Utilizar até 2 µl de amostra na corrida de sequenciamento.

As sequências foram lidas em um sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.2.18. Análises moleculares

Todas as sequências foram analisadas no programa Geneious Pro 4.8.5 (criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>). Os alinhamentos foram realizados utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no programa Geneious e disponível online no link <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>. As análises de diversidade genética foram conduzidas no programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009) e as análises de divergência evolutiva e testes de seleção no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007) usando o método de Nei-Gojobori. As análises de divergência genética utilizaram o modelo de Neighbor-Joining e os *gaps* foram tratados com o parâmetro *pairwise deletion*.

Foram construídas árvores de máxima verossimilhança para os DNAr 18S, histonas H1, H3 e regiões do ITS, utilizando o software PhyML (Guindon *et al.*, 2010) considerando um modelo GTR+G e uma análise de *bootstrap* com 1000 repetições. Foi inferida uma árvore de espécies com todas as sequências obtidas a partir do DNAr das

espécies de *Astyanax* e do cromossomo B de *A. paranae* para todas as regiões com dois ou mais clones por grupo, ou seja, H1, H3 e o ITS, utilizando o software *BEAST (Heled e Drummond, 2010). Foram lançadas três MCMC durante 10^8 gerações, amostrando uma árvore a cada mil gerações. Nós avaliamos a convergência das três corridas com Tracer, combinado as árvores resultantes com LogCombiner depois de aplicar *burnin* de 10%.

Todas as sequências foram utilizadas como amostras para uma busca usando o BLAST (Altschul *et al.*, 1990) contra a base de dados de nucleotídeos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KJ129765 (*Rex1*), KJ129638-KJ129645 (COI), KJ129646-KJ129668 (histona H1), KJ129669-KJ129692 (histona H3), KJ129693- KJ129728 (ITS1), KJ129729-KJ129764 (ITS2) and KJ129623-KJ129637 (DNAr 18S).

As sequências de COI foram submetidas à identificação no BOLDSystems (http://www.barcodinglife.com/index.php/IDS_OpenIdEngine). Para a identificação da espécie *A. bockmanni* foram utilizadas sequências de COI depositadas no GenBank sob os números de acesso KC153991- KC153994.

As comparações estatísticas por Chi-quadrado e teste t de Student foram feitas em programa adequado.

4. Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em indivíduos de uma população de *Astyanax paranae* são apresentados a seguir. A colocação na forma de artigo científico foi feita no sentido de facilitar a delimitação das informações para posterior publicação.

As referências citadas neste capítulo encontram-se relacionadas no final da dissertação.

Delimitando a origem de um cromossomo B por hibridação *in situ* fluorescente, pintura cromossômica e sequenciamento de DNA em *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes)

Palavras-chave: origem intraespecífica, famílias multigênicas, DNAr, DNA repetitivo, histonas

Resumo

Cromossomos supranumerários (Bs) podem conter uma grande variedade de sequências repetitivas de DNA, tais como DNA satélite, DNA ribossomal 45S (DNAr), genes de histonas e transposons. Por esta razão, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma ferramenta útil para se determinar a origem destes elementos genômicos enigmáticos, especialmente quando combinada com a pintura cromossômica a partir de cromossomos B microdissecados. Aqui, realizamos estas duas abordagens em conjunto com a análise molecular de sequências de DNA para investigar a origem dos cromossomos B no peixe *Astyanax paranae*. A microdissecção cromossômica foi feita utilizando apenas um braço do cromossomo B metacêntrico grande (Bm). Interessantemente, a pintura cromossômica com esta sonda mostrou sinais de hibridação em ambos os braços do cromossomo Bm, e sinais de homologia com alguns cromossomos do complemento A (particularmente os cromossomos 2 e 23). A técnica de FISH revelou a presença blocos de histona H1 e clusters de DNAr 18S simetricamente localizados em ambos os braços do cromossomo Bm, com genes da histona H1 flanqueando a região centromérica e o DNAr 18S em posição distal em ambos os braços do cromossomo Bm. Portanto, os dados obtidos suportam a hipótese de que o cromossomo B de *A. paranae* foi originado pela formação de isocromossomo, e, provavelmente, o ancestral ao B surgiu a partir dos cromossomos 2 ou 23 (ambos contém H1 e DNAr 18S). Foi detectada também a presença tendenciosa de cromossomos B nas fêmeas de *A. paranae*, o que sugere que os cromossomos B desta espécie podem influenciar a determinação sexual. Conseqüentemente, é possível propor que os cromossomos 2 ou 23 podem corresponder a cromossomos sexuais em *A. paranae*. O sequenciamento de DNA (DNAr e histonas) presente no cromossomo B mostrou uma alta similaridade em relação a sequencias obtidas a partir de cromossomos A da própria espécie, o que suporta uma origem intraespecífica para o cromossomo B de *A. paranae*.

Abstract

Supernumerary (B) chromosomes have been shown to contain a variety of repetitive DNA sequences, such as satellite DNA, 45S ribosomal DNA (rDNA), histone genes and mobile elements. For this reason, fluorescent in situ hybridisation (FISH) is a useful tool for ascertaining the origin of these enigmatic genomic elements, especially when combined with chromosome painting from microdissected B chromosomes. Here, we perform these two approaches to investigate the origin of B chromosomes in the fish *Astyanax paranae*. Chromosome microdissection was performed using only one arm of a large B metacentric (Bm) chromosome. Interestingly, chromosome painting with this probe showed hybridization signals in both arms of the Bm chromosome, and homology signals in some chromosomes of the complement A (particularly the chromosomes 2 and 23). FISH mapping revealed the presence of histone H1 and 18S rRNA gene clusters symmetrically located in both arms of the Bm chromosome, with H1 genes flanking the centromeric region and 18S rRNA genes in the terminal region of both chromosome arms. Therefore, our data support the hypothesis that Bm chromosome of *A. paranae* was originated by formation of isochromosome, and probably the B ancestor arose from the chromosomes 2 or 23 (both contain H1 and 18S genes), although the origin from chromosome 23 is more parsimonious. We also detected a female-biased B chromosome presence in *A. paranae*, which suggests that B chromosomes in this species influence sex determining. Consequently, it is possible to propose that chromosomes 2 or 23 (B ancestor) might correspond to sex chromosomes in *A. paranae*. DNA sequencing of gene fragments (rDNA and histone) present on the B chromosomes showed a high similarity in relation to the sequences obtained from A chromosomes of own species, which supports the intraspecific origin of B chromosomes in *A. paranae*.

Introdução

Aproximadamente 15% das espécies eucarióticas possuem cromossomos supranumerários (Bs), que são um conjunto de elementos genômicos dispensáveis presentes em apenas alguns indivíduos de uma dada população. Na maioria dos casos, os cromossomos B se comportam como elementos parasitas e prosperam em populações naturais devido à sua vantagem na transmissão e por não obedecer às regras de Mendel (Östergren, 1945; Nur, 1966; Nur, 1977; Jones, 1985, 1991; Werren *et al.*, 1987). Em alguns casos, os cromossomos B parecem proporcionar alguma vantagem para o genoma do hospedeiro e podem assim ser considerados heteróticos (Darlington, 1958; White, 1973). Exemplos de cromossomos B vantajosos são relatados em *Nectria haematococca* com cromossomos B favorecendo a patogenicidade deste fungo (Miao *et al.*, 1991) e em *Allium schenoprassum*, no qual os cromossomos B podem aumentar a viabilidade da semente à muda (Plowman e Bougourd, 1994).

Historicamente, os cromossomos B foram considerados elementos genômicos inertes (para revisão, ver Camacho, 2005), mas pesquisas recentes mostraram a transcrição de vários tipos de genes que residem em cromossomos B, tais como, rRNA (Leach *et al.*, 2005; Ruíz-Estévez *et al.*, 2012), DNA repetitivo com semelhança a elementos móveis (Carchilan *et al.*, 2009) e genes codificadores de proteínas no veado siberiano *Capreolus pygargus* (Trifonov *et al.*, 2013). Curiosamente, em uma espécie de peixe ciclídeo foi mostrado que os cromossomos B podem ter um efeito funcional na determinação do sexo feminino, na qual ocorrem cromossomos B restritos às fêmeas (Yoshida *et al.*, 2011). Este mecanismo é semelhante ao caso da relação cromossômica sexual paterna (PSR) em vespas, nas quais um cromossomo B tem o efeito oposto, isto é, transformando zigotos do sexo feminino em machos e assim, cromossomos B são restritos aos machos (Werren *et al.*, 1987; Werren e Stouthamer, 2003).

A composição do DNA dos cromossomos B é desconhecida na maioria dos casos, mesmo este sendo um tema interessante na pesquisa cromossomo B. Em geral, cromossomos B são ricos em DNA repetitivo de várias classes, incluindo 45S DNA ribossomal (rDNA), DNA satélite, genes para histonas e elementos móveis (Camacho, 2005; Bugrov *et al.*, 2007; Teruel *et al.*, 2010). A pintura cromossômica tem sido utilizada em várias espécies para verificar se os cromossomos B compartilham sequências com os cromossomos A da espécie ou de espécies relacionadas (Bugrov *et al.*, 2003, 2007; Rubtsov *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2008; Teruel *et al.*, 2009a, b; Vicari *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013). Além disso, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para o mapeamento de DNA repetitivo também forneceu informações valiosas em alguns casos (Teruel *et al.*, 2010; Vicari *et al.*, 2011; Mestriner *et al.*, 2000; Stitou *et al.*, 2000; Dhar *et al.*, 2002; Polleto *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013). Recentemente, a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) foi aplicada à pesquisa sobre os cromossomos B em três espécies: o fungo *Mycosphaerella graminicola* (Goodwin *et al.*, 2011), a mosca da fruta *Drosophila albomicans* (Zhou *et al.*, 2012) e centeio *Secale cereale* (Martis *et al.*, 2012). Esta abordagem mostrou que o conteúdo do cromossomo B é uma mistura complexa de diferentes tipos de sequências de DNA, incluindo os tipos já conhecidos de DNA repetitivos (ver acima), muitas inserções de DNA organelar e genes de cópia única pseudogenizados que são transcritos (Martis *et al.*, 2012 ; Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013).

No entanto, a tecnologia de NGS ainda não foi aplicada aos cromossomos B em peixes, embora cromossomos B tenham sido descritos em vários grupos destes organismos (Oliveira *et al.*, 2009). Entre eles, o gênero *Astyanax* representa um modelo interessante para estudar os cromossomos B, com registros de ocorrência em nove espécies (Moreira-Filho *et al.*, 2004; Fernandes e Martins-Santos, 2005; Carvalho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Daniel *et al.*, 2012).

Entretanto, os dados significativos sobre a origem e evolução desses cromossomos são restritos à espécie *A. scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2011).

Com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a composição, origem, evolução e possível função dos cromossomos B em *A. paranae*, nós realizamos pintura cromossômica com sondas do B-DNA microdissectado e mapeamento por FISH com uma variedade de sondas de DNA repetitivos (DNAr 5S e 18S; histonas H1, H3 H4; elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3*). Além disso, nós analisamos sequências de alguns DNAs repetitivos (DNAr e histonas H1 e H3) amplificados a partir do cromossomo B e do DNA genômico 0B de espécimes de *A. paranae* e outras três espécies de *Astyanax*. Esta abordagem permitiu delimitar a possível origem do cromossomo B a apenas dois cromossomos do complemento A.

Materiais e Métodos

Origem das amostras e análise citogenética

Foram coletados aleatoriamente 50 indivíduos (18 machos e 32 fêmeas) da espécie de peixe *Astyanax paranae* Eigenmann, 1914 e alguns indivíduos sem cromossomos B das espécies *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* no rio Capivara, pertencente à bacia hidrográfica do Rio Tietê (22 ° 53'57 " S / 48 ° 23'11 " W), perto de Botucatu (São Paulo, Brasil). As amostras foram coletadas de acordo com os procedimentos recomendados pela legislação brasileira de proteção ambiental (Coleção Permissão MMA / IBAMA / SISBIO - número 3245) e a amostragem, manutenção e análise das amostras foram realizadas de acordo com os protocolos internacionais sobre a experimentação animal, seguido pela Universidade Estadual Paulista (Protocolo CEEAA / IBB / UNESP - número 405). Os espécimes foram

identificados e depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, São Paulo, Brasil, sob os números de acesso LBP13340 (*A. paranae*), LBP13342 (*A. bockmanni*), LBP13344 (*A. fasciatus*) e LBP13346 (*A. altiparanae*).

Para realizar a análise citogenética, os espécimes foram anestesiados e dissecados e os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de fragmentos de tecido de rim e brânquias utilizando a técnica seguida por Foresti *et al.* (1981). O bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972) e as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) foram identificadas de acordo com a técnica descrita por Howell e Black (1980). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com o critério estabelecido por Levan *et al.* (1964), sendo estes classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st), e acrocêntricos (a), para a disposição no cariótipo numa ordem decrescente de tamanho.

Microdissecção cromossômica

A microdissecção dos cromossomos foi realizada em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100. Foi microdissecado um cromossomo Bm completo para o sequenciamento de DNA (μ B-DNA). Além disso, duas sondas de DNA diferentes derivadas de cromossomos B foram geradas para a FISH, sendo elas: um braço do cromossomo Bm (μ Bm-probe) (a fim de testar a sua natureza de isocromossomo e, a partir do cromossomo submetacêntrico B completo (Bsm) (μ Bsm-probe). Os cromossomos e fragmentos cromossômicos microdissecados foram colocados em 9 μ l de água ultrapura livre de DNase, tendo sido amplificados utilizando o kit GenomePlex Single Whole Genome Amplification (wga4-Sigma) (Gribble *et al.*, 2004). Com o DNA amplificados, foram geradas sondas de DNA (μ Bm-probe e μ Bsm-probe) marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied

Science) utilizando o kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification (wga3-Sigma), seguindo o protocolo do fabricante.

Amplificação de DNA, clonagem e sequenciamento

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para as confirmações taxonômicas do material coletado, foi realizada a técnica do DNA *barcoding* pela amplificação de uma sequência parcial do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I (COI), utilizando os primers FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward *et al.*, 2005).

Sequências parciais do DNAr 18 e 5S, ITS, dos elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* e para os genes das histonas H1, H3, H4 foram obtidas por PCR a partir do DNA genômico de *A. paranae* (gDNA) usando os *primers* descritos na Tabela 1 (materiais e métodos). As reações utilizaram 1X PCR buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 U de *Taq* polymerase (Invitrogen), 0.1 µM de cada *primer* e 50 ng of gDNA. O ciclo básico para amplificar estas regiões consistiu em denaturar o DNA a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 45 s a Tanelamento °C, 1 min a 72 °C e uma extensão final de 10 min a 72 °C.

O DNAr 18S, ITS e as histonas H1 e H3 foram amplificados a partir do µB-DNA e do gDNA de *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae*, sendo os produtos de PCR sequenciados e sua identidade confirmada em um BLAST. Foram clonadas as bandas obtidas por PCR para estes genes a partir do DNA de ambas as origens, genômica (gDNA) e do cromossomo B microdissecado (µB-DNA), ligando-os ao vetor de clonagem TOPO TA e clonando em células competentes One Shot® TOP10. O DNA plasmidial foi isolado com o uso do kit Perfectprep® Plasmad Mini kit

(Eppendorff). Cada plasmídeo foi sequenciado em ambas as direções usando os *primers* M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Para todas as sequências de DNA, os produtos de PCR foram purificados usando o kit de ExoSAP-TI (USB Corporation) e foram sequenciados com o kit Big Dye® TM Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 Reaction Ready (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Para a técnica de FISH, os cromossomos foram tratados de acordo com os procedimentos descritos por Pinkel *et al.* (1986), utilizando 77 % de estringência. As sondas marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) tiveram o seu sinal detectado com avidina-FITC (Roche Applied Science) e as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) tiveram o seu sinal detectado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). As imagens foram capturadas com câmera digital Olympus DP70, acoplada a um fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX61. O tratamento das imagens, incluindo a montagem dos cariótipos e otimização de brilho e contraste, foi realizada utilizando o programa Adobe Photoshop CS4.

Análise Molecular

Todas as sequências de DNA foram inicialmente analisadas com o programa Geneious Pro 4.8.5 criado por Biomatters (Disponível em <http://www.geneious.com>) e o alinhamento das sequências foi feito usando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no software Geneious Pro 4.8.5. As análises de diversidade do DNA foram realizadas com o software DnaSP (Librado e Rozas, 2009). As análises de divergência evolutiva e testes de seleção foram realizados com o software MEGA

(Tamura *et al.*, 2007) utilizando o método de Nei-Gojobori (Nei e Gojobori, 1986). Foram construídas árvores de máxima verossimilhança para os DNAr 18S, histonas H1, H3 e das regiões do ITS, utilizando o software PhyML (Guindon *et al.*, 2010) considerando um modelo GTR+G e uma análise de *bootstrap* com 1000 repetições. Foi inferida uma árvore de espécies com todas as sequências obtidas a partir do DNAr das espécies de *Astyanax* e do cromossomo B de *A. paranae* para todas as regiões com dois ou mais clones por grupo, ou seja, H1, H3 e o ITS, utilizando o software *BEAST (Heled e Drummond, 2010). Foram lançadas três MCMC durante 10^8 gerações, amostrando uma árvore a cada mil gerações. Nós avaliamos a convergência das três corridas com Tracer e combinado as árvores resultantes com LogCombiner depois de aplicar *burnin* de 10%.

Todas as sequências foram utilizadas como amostras para uma busca usando o BLAST (Altschul *et al.*, 1990) contra a base de dados de nucleotídeos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KJ129765 (*Rex1*), KJ129638-KJ129645 (COI), KJ129646-KJ129668 (histona H1), KJ129669-KJ129692 (histona H3), KJ129693- KJ129728 (ITS1), KJ129729-KJ129764 (ITS2) and KJ129623-KJ129637 (DNAr 18S). As sequências de COI foram submetidas à identificação no BOLDSystems (<http://www.barcodinglife.com/>). Para a identificação da espécie *A. bockmanni* foram utilizadas sequências de COI depositadas no GenBank sob os números de acesso KC153991- KC153994.

As comparações estatísticas por Chi-quadrado e teste t de Student foram feitas em programa adequado.

Resultados

A identificação molecular no BOLDSystems mostrou que as amostras analisadas correspondem a *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae*, com 100% de similaridade. As amostras analisadas apresentaram cariótipos com $2n=50$ cromossomos ($8m+12sm+14st+16a$, $NF=84$), conforme mostrado na Figura 1a. Além disso, cromossomos B foram observados em 100 % das células analisadas de doze fêmeas, sendo que macrocromossomos B submetacêntricos (Bsm) foram identificados em duas fêmeas e macrometacêntricos B (Bm) foram observados em dez fêmeas analisadas (Figura 1a). Todas as células apresentaram apenas um cromossomo B de qualquer destes tipos. Em apenas um dos dezoito machos analisados foi encontrado um cromossomo Bm. A aplicação de teste de contingência mostrou uma frequência maior dos cromossomos B no sexo feminino, proximamente significativa ($\chi^2=3,67$; $GL=1$; $P=0,0555$).

Análise cromossômica

O bandamento C mostrou a presença de pelo menos dois tipos de heterocromatina nos cromossomos, sendo uma mais clara e presente em alguns cromossomos A e nos cromossomos B e outra de aspecto mais escuro, presente na região terminal dos braços longos dos pares acrocêntricos de 18 a 22 (Figura 1b). As Ag-RONs mostraram variação intrapopulacional, com o par 12 sendo o sítio principal de atividade e o par 2 mostrando atividade de modo esporádico (Figura 1b). Nenhuma Ag-RON ativa foi observada nos cromossomos B.

De modo consistente com os padrões de Ag-RON, um sítio de DNAr 18S foi identificado no braço curto do cromossomo 12. Em ambos os tipos de cromossomos B

foram identificados sítios de DNAr 18S na região distal, nos dois braços cromossômicos (Figuras 1c, d, 2b, c). No entanto, observou-se a presença variável de clusters de DNAr também nos cromossomos 1, 2, 7, 11, 18 e 23 do complemento A (Figuras 1c, d, 3). Porém, como demonstrado pela aplicação da técnica Ag-RON, apenas o DNAr do cromossomo 2 foi observado ativo entre estes sítios (Figura 1b, em destaque).

O DNAr 5S foi localizado na região pericentromérica do braço curto dos pares 2 e 20 (Figuras 1c, 2a). Sítios de histonas H1, H3 e H4 foram encontrados em sintenia nos braços curtos dos cromossomos 2 e 23 (Figuras 1d, 2a, 2b, 2c).

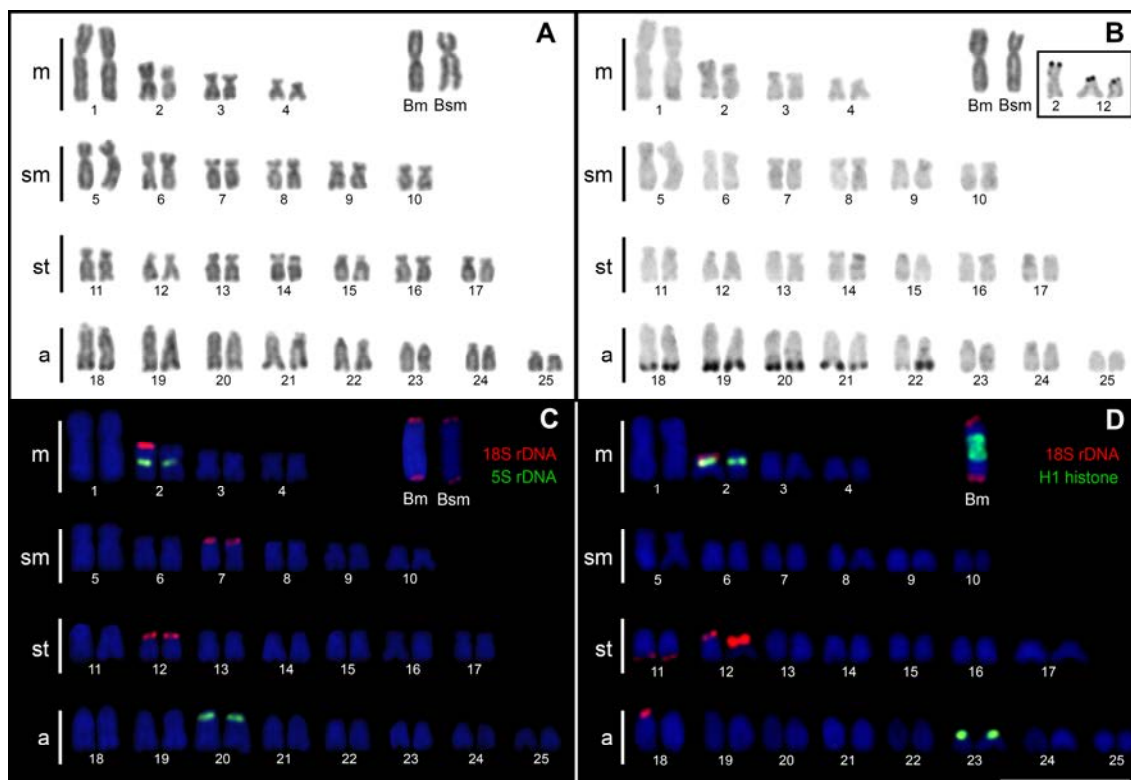


Figura 1 Cariótipos de *Astyanax paranae* após coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento C (b) e após FISH com sondas de rDNA18S e 5S (c) e rDNA18S e histona H1 (d). No destaque em (b), os cromossomos Ag-RON positivos. Barra=10µm.

Adicionalmente, os genes da histona H1 foram detectados na região pericentromérica do cromossomo Bm, simetricamente em ambos os braços. No cromossomo Bsm, houve uma distribuição desigual dos genes da histona H1, com um maior acúmulo no braço longo (Figura 2a). O elemento transponível *Rex1* foi identificado de forma dispersa em todos os cromossomos do complemento A (Figura 2d), mas o elemento *Rex3* foi identificado de forma compartimentalizada, formando *clusters* nas regiões heterocromáticas dos cromossomos acrocêntricos de números 18 a 22 (Figura 2e). A técnica de pintura cromossômica mostrou padrões semelhantes para as duas sondas testadas (μ Bm-probe e μ Bsm-probe), com os cromossomos Bm e Bsm sendo completamente marcados pelas duas sondas, em conjunto com pequenos sinais em alguns cromossomos do complemento A (Figura 2f). Notavelmente, alguns desses sinais mostraram-se coincidentes com os sítios ribossomais e com as histonas, principalmente nos braços curtos dos pares 2 e 23 (Figura 2f). Todas as informações obtidas pela pintura cromossômica e FISH encontram-se resumidas em um ideograma na Figura 3.

Análise das sequências de DNA

Foram feitas tentativas de amplificação dos vários tipos de DNA repetitivo (ITS1 e ITS2, DNAr 5S e 18S e histonas H1, H3 e H4) do DNA genômico de indivíduos 0B e do DNA microdissecado do cromossomo B. Todos os tipos destes DNAs repetitivos amplificaram a partir do 0B-gDNA, mas apenas o ITS1, ITS2, DNAr 18S e as histonas H1 e H3 foram amplificados a partir do DNA do cromossomo B.

Uma comparação da diversidade de nucleotídeos para as sequências de DNA encontradas nos cromossomos B microdissecados em relação àquelas obtidas a partir de

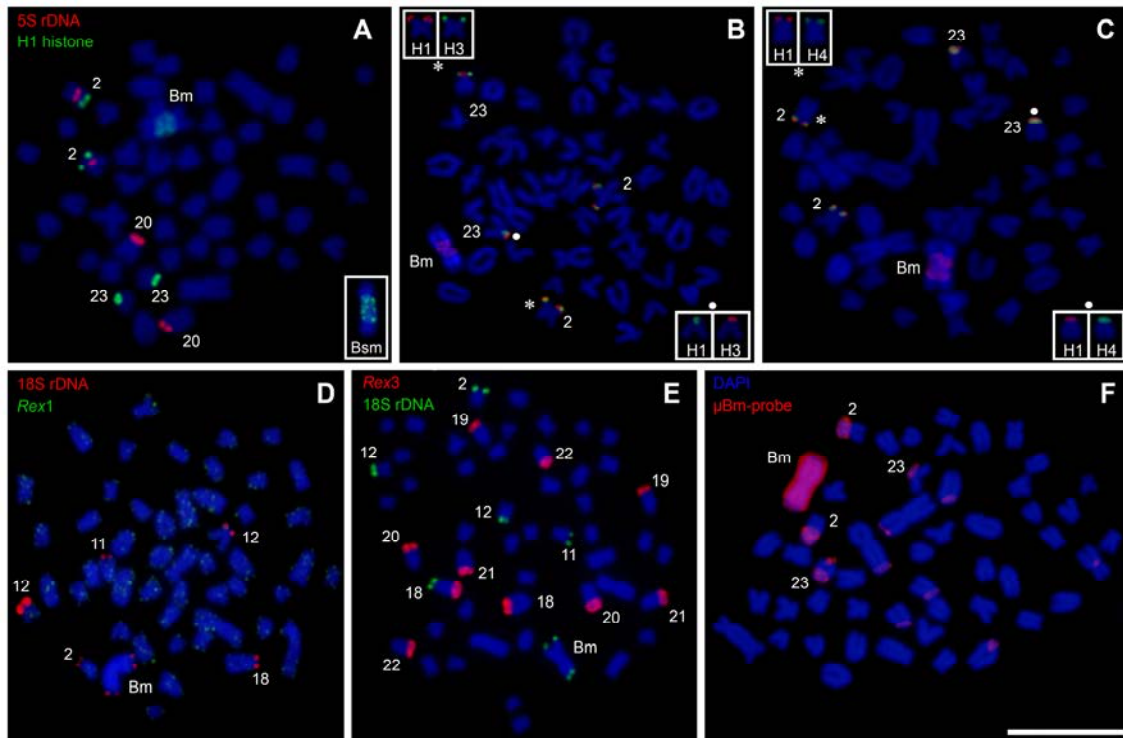


Figura 2 Metáfases de *A. paranae* após FISH com sondas de rDNA5S e histona H1 (a), histonas H1 e H3 (b), histonas H1 e H4 (c), rDNA 18S e *Rex1* (d), rDNA 18S e *Rex3* (e) e pintura cromossômica com sonda μ Bm-probe (f).

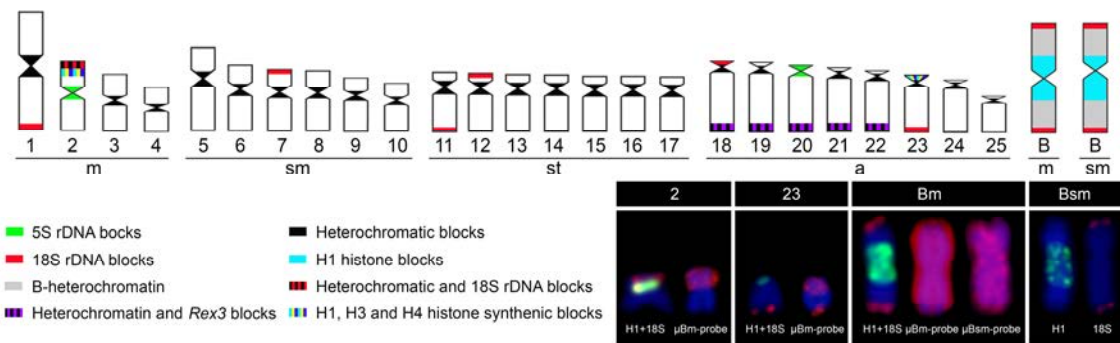


Figura 3 Idiograma mostrando a localização dos marcadores citogenéticos utilizados neste estudo em *A. paranae* (acima) e quadro comparativo entre os cromossomo 2, 23, Bsm e Bm utilizando os marcadores de DNAr 18S, histona H1 e pinturas cromossômicas (abaixo, direita).

indivíduos sem cromossomos B (0B) mostrou diferenças significativas para o DNAr 18S, a região do ITS1 e o gene da histona H3, mas não para a região ITS2 ou para as sequências do gene da histona H1 (Tabela 1). O ITS1 e a histona H3 apresentaram menor diversidade de nucleotídeos nas cópias do cromossomos B, enquanto que a região codificadora do DNAr 18S mostrou maior diversidade nas cópias do cromossomo B.

No caso dos genes codificantes de proteínas H1 e H3, as regiões amplificadas incluíram os códons 14-163 da H1 e os códons 4-121 da H3. Seis das 150 posições de aminoácidos analisados para a histona H1 apresentaram variação, enquanto que nenhuma variação foi encontrada para a histona H3. No entanto, não foram observados *stop codons* em nenhuma das sequências analisadas.

Tabela 1 Diversidade nucleotídica (π) para as sequências de DNA analisadas e teste de t de Student (t) comparando as sequências (0B-gDNA) e B (μ B) dos cromossomos do complemento A. n=número de sequências, S= número de sítios de segregação, Hap=número de haplótipos, SE=erro padrão, df=graus de liberdade, P=probabilidade.

Gene	Amostra	n	bases	S	Hap	π	SE	t	df	P
18S	0B-gDNA	8	1338	8	6	0.0019	0.0002			
	μ B	5	1338	21	5	0.0072	0.0007	-7.48	11	0.00001
ITS1	0B-gDNA	5	428	20	4	0.0250	0.0033			
	μ B	10	422	10	8	0.0051	0.0003	5.98	13	0.00005
ITS2	0B-gDNA	5	384	3	3	0.0032	0.0006			
	μ B	10	384	6	5	0.0031	0.0004	0.04	13	0.97173
H1	0B-gDNA	8	451	22	7	0.0230	0.0020			
	μ B	8	451	29	6	0.0172	0.0027	1.71	14	0.10860
H3	0B-gDNA	9	355	25	5	0.0174	0.0032			
	μ B	7	355	8	5	0.0093	0.0008	2.43	14	0.02887

Foi calculado o número de substituições sinônimas e não-sinônimas por sítios sinônimos (dS) e não-sinônimos (dN), respectivamente, para cada grupo de sequências, tendo sido verificado que, como mostra a Tabela 2, não foram observadas diferenças significativas entre as sequências de DNA provenientes dos cromossomos do complemento A (0B-gDNA) ou dos cromossomos B (μ B). Ambas as substituições sinônimas e não sinônimas foram encontradas para o gene de histona H1 em ambos os tipos de sequências de DNA (0B-gDNA e μ B), com razões de dN/dS muito menores do que 1, mas sendo três vezes mais elevada para as sequências de DNA provenientes do cromossomo B (Tabela 2), sugerindo a possibilidade de que a seleção de purificação poderia estar relaxada para os genes de H1 localizados nos cromossomos B, como seria de se esperar se este cromossomo estivesse geneticamente inativo. Uma comparação dos haplótipos de histona H1 de *A. paranae* com aqueles obtidos em outras espécies de *Astyanax* realizada pelo teste de neutralidade de Nei-Gojobori, forneceu provas significativas para a hipótese de ocorrência de seleção purificadora (Tabela S1). Árvores de máxima verossimilhança construídas com as sequências obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados e do 0B-gDNA de *A. paranae*, *A. bockmanni* e *A. fasciatus*, utilizando *A. altiparanae* como grupo externo, não foram resolutivas para o DNAr 18S e para os dois genes de histonas, devido à variação escassa observada (Figuras S1 a S3). As regiões do ITS, concatenadas, sugeriram uma maior semelhança entre as sequências obtidas do cromossomo B e do 0B-gDNA de *A. paranae* e *A. bockmanni*, e baixa similaridade com o DNA de *A. fasciatus* (Figura 4). Entretanto, uma árvore de espécies feita pelo método *BEAST para os genes de histona e para a região do ITS indicou que as sequências contidas no cromossomo B de *A. paranae* são mais similares com aquelas dos cromossomo A da própria espécie, assim demonstrando uma origem intraespecífica para o cromossomo B (Figura5).

Tabela 2 Número de substituições sinônimas e não-sinônimas por sítio sinônimo (dS) e não-sinônimo (dN), respectivamente, observadas nas sequências dos genes para as histonas H1 e H3 das amostras 0B-gDNA e μ B-DNA.

Gene	Amostra	n	dN	SE	t	df	P	dS	SE	t	df	P	dN/dS
H1	0B-gDNA	8	0.004	0.002				0.077	0.016				0.052
	μ B	8	0.007	0.002	-1.06	14	0.307	0.045	0.01	1.70	14	0.112	0.156
H3	0B-gDNA	9	0	0				0.068	0.011				0
	μ B	7	0	0				0.036	0.012	1.97	14	0.069	0

Discussão

Cromossomos B no gênero *Astyanax* foram relatados pela primeira vez em *A. scabripinnis* como um grande cromossomo metacêntrico, semelhante ao primeiro par do cariótipo (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1992). A partir destas observações, vários tipos de cromossomos B foram encontrados em diferentes espécies deste gênero, mostrando variações na morfologia, tamanho e composição do DNA (Moreira-Filho *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). Em *A. paranae*, grandes cromossomos B também foram relatados em exemplares estudados na bacia do Rio Tietê (Maistro *et al.*, 1992; Porto-Foresti *et al.*, 1997), sendo, contudo, pouco frequentes informações sobre a composição destes elementos. Os resultados obtidos com a aplicação da técnica de pintura cromossômica com sondas de DNA obtidas a partir dos cromossomos B em *A. paranae* no presente trabalho sugerem a presença de sequências de DNA compartilhado entre cromossomos do complemento A e B desta espécie. Estes resultados e a forte semelhança entre as sequências μ B-DNA e 0B-gDNA (Figura 4)

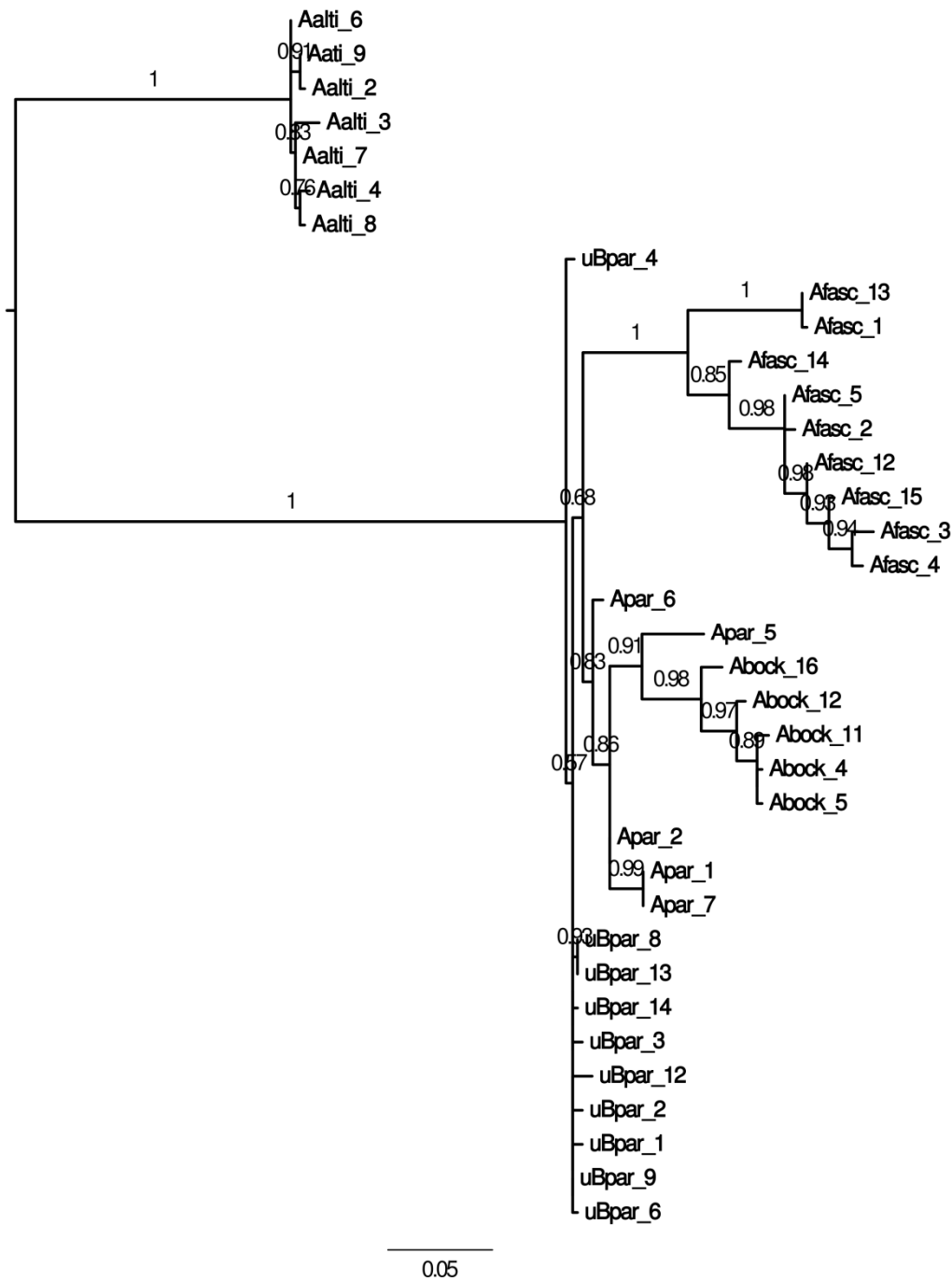


Figura 4 Árvore de máxima verossimilhança construída com as sequências do ITS concatenadas obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados, 0B-gDNA de indivíduos *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus*, com *A. altiparanae* (Aalti) como grupo externo. Note-se a elevada similaridade entre as sequências cromossômicas (μ Bpar) e aqueles obtidos a partir de 0B-gDNA de *A. paranae* (Apar) e *A. bockmanni* (Abock), e a baixa similaridade com aquelas de *A. fasciatus* (Afasc).

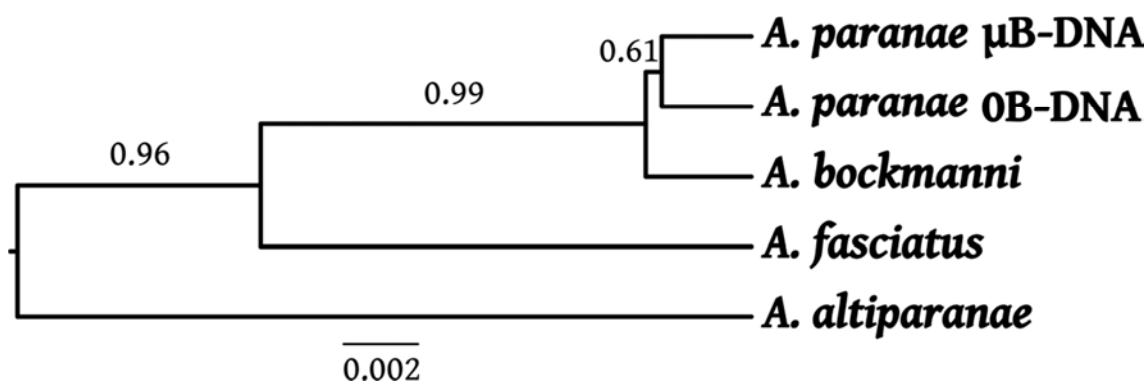


Figura 5 Árvore de espécies construída por *BEAST com os genes de histonas e regiões do ITS. Note-se que as sequências de DNA de *A. paranae* obtidos a partir dos cromossomos B microdissecados (μ B-DNA) são mais semelhantes aos do genoma hospedeiro (OB-gDNA).

sugerem uma origem intraespecífica do cromossomo B (ver Camacho, 2005) e apontam para alguns cromossomos do complemento A, especificamente os pares 2 e 23, como possíveis candidatos para a ancestralidade do B. No entanto, o anonimato de sondas de DNA a partir da técnica de pintura cromossômica evita ir além deste resultado superficial. Porém, os resultados da aplicação da técnica de FISH com diversas sondas de DNA repetitivo permitiram ultrapassar este obstáculo.

Em peixes, apenas DNA satélite e DNAr 45S haviam sido encontrados anteriormente nos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000), *Prochilodus lineatus* (Artoni *et al.*, 2006), *Astatotilapia latifasciata* (Poletto *et al.*, 2010), além da descrição de atividade nucleolar identificada pela técnica Ag-RON em cromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Hashimoto *et al.*, 2012). No presente trabalho é mostrada a primeira evidência para a presença de genes de proteínas histônicas em um cromossomo B de peixe, fato que havia sido relatado anteriormente apenas no gafanhoto *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010). Além disso, os dois tipos

de cromossomos B (Bm e da Bm) encontrados em *A. paranae* possuem DNAr 18S na região terminal de ambos os braços cromossômicos. A distribuição simétrica dos genes de DNAr 18S e histona H1 de ambos os braços, em respeito ao centrômero, sugere ser o cromossomo B um isocromossomo, como anteriormente demonstrado para um caso muito semelhante de macrocromossomo B em *A. scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000). De fato, a pintura cromossômica com a sonda μ Bm-probe, obtida a partir de um único braço do cromossomo B, marcou ambos os tipos de cromossomos Bsm e Bm encontrados nesta espécie, sugerindo assim a existência de homologia entre os dois braços dos cromossomos Bs e também homologia entre os dois tipos de cromossomos B.

Além disso, as diferenças encontradas entre o número relativo de genes para histona H1 em ambos os braços do Bsm com relação ao cromossomo Bm indica que a origem do Bsm pode ter se dado através de uma inversão pericêntrica, com pontos de interrupção assimétricos nas regiões de H1 de ambos os braços do cromossomo Bm. Notavelmente, cromossomos B metacêntricos semelhantes têm sido observados em *A. scabripinnis* (Vicente *et al.*, 1996; Mestriner *et al.*, 2000; Néo *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2003; Moreira-Filho *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2011). Seria interessante investigar a presença de genes para histonas H1 nos cromossomos B de *A. scabripinnis*, sendo que esta pesquisa abordaria a questão da origem de cromossomos B que mostram tamanhos e morfologias muito semelhantes em várias espécies de *Astyanax*, esclarecendo o fato de que o aparecimento do cromossomo B poderia ter precedido os processos de especiação para algumas destas espécies, como é sugerido por Moreira-Filho *et al.* (2001).

A origem de cromossomos B por isocromossomo em *A. paranae* leva à conclusão de que o cromossomo Bsm é derivado do Bm. Além disso, uma vez que o Bm mostra dois braços homólogos, qualquer explicação de origem do cromossomo B

tem de ser limitada a apenas um braço e como etapa final, em qualquer hipótese da origem do B nesta espécie, necessariamente à divisão incorreta do centrômero de um cromossomo acrocêntrico B para se obter um metacêntrico. Entre as sondas de DNA analisadas pelo mapeamento FISH, não foram encontradas informações úteis para DNAr 5S ou para transposons *Rex*, mas os resultados obtidos com o DNAr 18S e genes de histonas apontaram claramente para dois cromossomos do complemento A como os mais prováveis ancestrais dos cromossomos B nesta espécie. Estes seriam os cromossomos 2 e 23, com base no fato de que eles são os únicos cromossomos do complemento A que portam os dois DNAs repetitivos DNAr 18S e os genes da histona H1 encontrados nos cromossomos B. Estas sequências gênicas ocupam locais distantes dos cromossomos B, estando a da histona H1 localizada próxima da região centromérica, enquanto a do DNAr 18S está localizada próxima das regiões dos telômeros. A comparação deste posicionamento com a localização destas sequências de DNAs repetitivos nos cromossomos 2 e 23 também indica que a origem dos cromossomos B pode não ter sido simples.

Se o ancestral foi o cromossomo 2, os cromossomos B poderiam ter derivado da região do braço curto contendo as sequências para histona H1 e DNAr 18S, mas, em seguida, sequências de DNA adicional deveriam ter sido colocadas entre o segmento para histona H1 e o DNAr 5S centromérico deveria ter sido perdido. Alternativamente, o B pode ter sido derivado do braço longo do cromossomo 23, que contém os genes de histona H1 na sua região proximal. Isto poderia explicar a presença de DNAr 18S em posição distal e os genes da histona H1 proximais no cromossomo B, com a presença de DNA de natureza desconhecida, provavelmente heterocromatina do B entre os dois segmentos de DNA repetitivos. Tal proposição sugere o cromossomo 23 como a hipótese mais parcimoniosa sobre a origem dos cromossomos B nesta espécie. No entanto, ambas as hipóteses têm a ser explicado o problema da ausência de genes para

as histonas H3 e H4 nos cromossomos B, considerando-se o fato de que estas sequências são sintênicas com a histona H1 nos cromossomos 2 e 23. Notavelmente, um cromossomo muito semelhante, o 24, foi sugerido como ancestral do cromossomo metacêntrico B em *A. scabripinnis* (Mestriner *et al.* 2000), o que sugere a possibilidade de uma origem comum para cromossomos B nestas duas espécies (Moreira-Filho *et al.*, 2001).

A pressão seletiva relaxada em sequências de sequências para o gene H1 no cromossomo B poderia explicar a amplificação diferencial destes genes neste cromossomo, com acúmulo dessas sequências no cromossomo B. De fato, foi verificado que a falta de pressão seletiva nos cromossomos B de centeio permite o acúmulo do DNA repetitivo *Revolver* nestes elementos (Klemme *et al.*, 2013). O número de cópias de H3 é provavelmente menor no cromossomo B, uma vez que a presença desta sequência não foi observada por FISH. Tal fato poderia explicar a menor diversidade de nucleotídeos observada para este gene nas sequências do cromossomo B, em comparação com aquelas encontradas nos cromossomos do complemento A (Tabela 1).

Algumas das sequências para os genes de histona H1 e H3 isoladas a partir do cromossomo B de *A. paranae* mostraram a mesma sequência de aminoácidos que aquelas do DNA genômico nos indivíduos 0B-gDNA, sugerindo assim, que elas são potencialmente ativas. No gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, Ruíz-Estévez *et al.* (2013) detectaram a expressão de sequências de DNAr 18S derivadas do cromossomo B, o que confirma que as sequências do B são potencialmente ativas e podem contribuir para as funções do genoma do hospedeiro. Em centeio, sequências pseudogênicas de cromossomos B são expressas e têm potencial para regular a expressão dos genes localizados nos cromossomos do complemento A (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). Estes exemplos mostram que os cromossomos B não seriam elementos genômicos

inertes e será interessante investigar se os genes presentes no cromossomo B de *A. paranae* estão ativos, contribuindo, assim, para funções no genoma do hospedeiro.

A diversidade de nucleotídeos observada no DNAr do cromossomo B, em comparação com a que é mostrada pelas mesmas sequências em cromossomos do complemento A, sugerem considerações interessantes. Primeiro, o DNA 18S apresentou maior diversidade no B do que nos cromossomos A, o que é consistente com a inatividade do rDNA no B. De fato, a técnica de Ag-NOR revela que o DNAr está sempre inativo no cromossomo B. Seria, portanto, de se esperar que a diversidade nucleotídica também fosse mais elevada no cromossomo B para as regiões do ITS. No entanto, ela foi semelhante para o ITS2 e significativamente menor para o ITS1 (ver Tabela 1). Uma possível explicação seria que a formação de quiasmas na região distal entre os dois braços homólogos, que no B de *A. paranae* envolveria o DNAr, poderia levar à homogeneização do DNA em ambos os braços do B através de *crossing over*. Apesar da possibilidade de ocorrência deste processo ser interessante, o número limitado de sequências analisadas também poderia ser o responsável por essas contradições, o que demandaria novas análises com maior amostragem.

A árvore de espécies construída com as sequências de histonas H1, H3 e das regiões do ITS (Figura 5) foi mais informativa do que as árvores dos genes (Figuras 4, S1- S3), separando claramente a espécie *A. bockmanni* e *A. paranae* das duas outras espécies (*A. altiparanae* e *A. fasciatus*), com probabilidade posterior de ramo sendo maior do que 0,95. Além disso, esta árvore mostra que o μ B-DNA de *A. paranae* está mais relacionado com o 0B-gDNA desta espécie, sugerindo uma origem intraespecífica para este cromossomo B. No entanto, a probabilidade posterior para o ramo que separa as sequências 0B e μ B em *A. paranae* daquelas de *A. bockmanni* foi apenas 0,61, lançando, assim, algumas dúvidas sobre a topologia obtida. Isto ocorre provavelmente devido ao fato de que *A. paranae* e *A. bockmanni* pertencem ao complexo de espécies *A.*

scabripinnis que inclui várias espécies estreitamente relacionadas que compartilham de um ancestral comum muito recente, e este último já poderia abrigar os cromossomos B que poderiam ser herdados pelas espécies descendentes (Moreira-Filho *et al.*, 2001). A microdissecção de cromossomos B nessas outras espécies e uma análise semelhante à realizada aqui para as sequências de DNA contidas nesses Bs poderia contribuir para esclarecer origem dos cromossomos B neste grupo de espécies. No entanto, dadas as relações estreitas entre estas espécies, seria aconselhável incluir espaçadores de genes de histona em vez de regiões codificantes.

A ocorrência de cromossomos B limitada a um sexo já foi descrita em *A. scabripinnis*, tal como um cromossomo micro B restrito aos machos (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993) ou um macro B restrito às fêmeas (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997). Estes casos foram interpretados como o resultado de uma possível eliminação do cromossomo extra a partir dos tecidos somáticos analisados (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993). Naturalmente, esta possibilidade não pode ser excluída sem analisar a linha germinal em todos estes casos. No entanto, uma explicação focada nos possíveis efeitos do conteúdo de genes no cromossomo B também poderia ser postulada. A amostra aqui analisada de *A. paranae* coletada no rio Capivara mostrou uma significativa distorção da proporção sexual para as fêmeas uma vez que, da amostra total de 50 indivíduos analisados, 32 eram do sexo feminino e apenas 18 eram do sexo masculino ($\chi^2=3,92$; GL=1; P=0,048). Numa amostra anterior desta mesma espécie coletada e analisada por Maistro *et al.* (1992) no rio Araquá (outro afluente do Rio Tietê) os autores encontraram indivíduos machos portadores de cromossomos B. Por outro lado, Porto- Foresti *et al.* (1997) também encontraram relação sexual distorcida nesta espécie, mostrando cromossomos B presentes em 57,1% dos indivíduos fêmeas e de 8,7% nos machos, no mesmo local de coleta. Um cenário semelhante foi observado para os grandes cromossomos B em *A. scabripinnis* (Vicente *et al.*, 1996). A ocorrência

de frequência distorcida na proporção sexual do cromossomo B em favor das fêmeas em *A. paranae* mostrada no presente trabalho sugere a possibilidade de que os cromossomos B nesta espécie poderiam influenciar o determinismo sexual. Conseqüentemente, é possível propor que os cromossomos 2 ou 23 (possíveis ancestrais ao B) podem corresponder a cromossomos sexuais em *A. paranae*. Notavelmente, Yoshida *et al.* (2011) recentemente forneceram evidências de que os cromossomos B em uma espécie de peixe ciclídeo exercem efeitos funcionais na determinação do sexo. Portanto, seria interessante investigar a presença de possíveis genes relacionados com os sistemas determinantes de sexo nos cromossomos de *A. paranae*, assim como sua possível atividade durante os estágios de desenvolvimento embrionário, onde a determinação do sexo está ocorrendo.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final da dissertação.

Tabela S1 Teste de neutralidade, seleção positiva e seleção purificadora “*Codon-based*” para as sequências de histona H1.

Hipótese	Z	P
Neutralidade (dN = dS)	-4.391	<0.001
Seleção positiva (dN > dS)	-4.184	1
Seleção purificadora (dN < dS)	4.317	<0.001

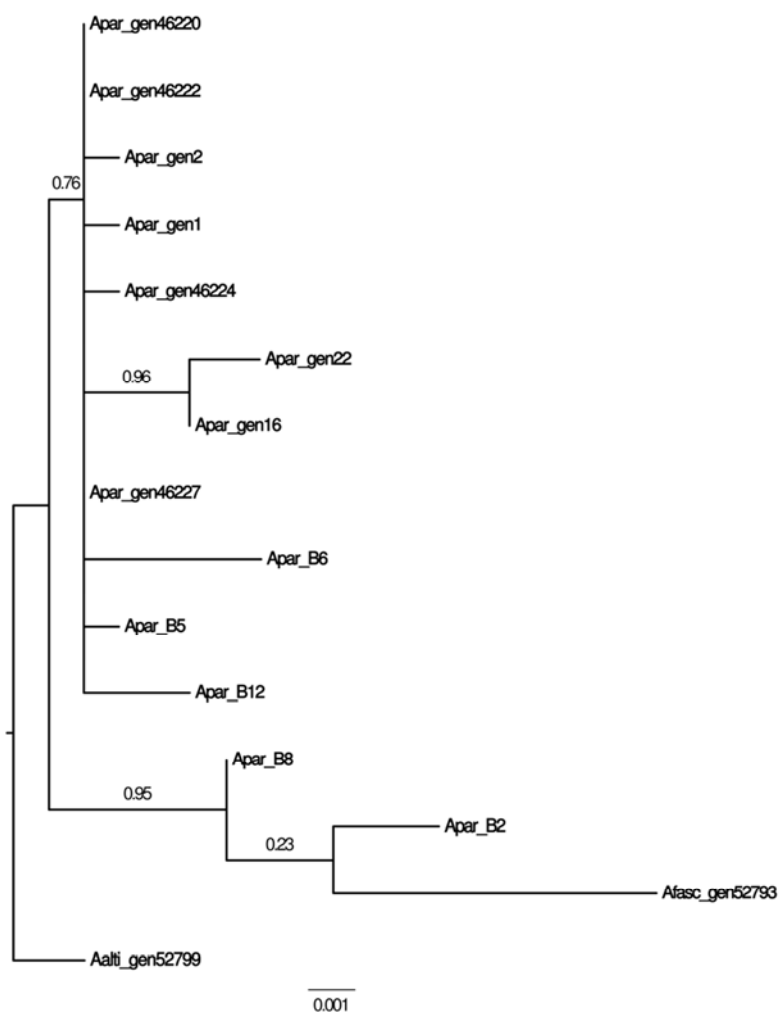


Figura S1 Árvore de máxima verossimilhança construída com as sequências de DNAr 18S obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados (*Apar_B*), gDNA de indivíduos 0B de *A. paranae* (*Apar_gen*), gDNA de espécimes de *A. fasciatus* (*Afasc*), com *A. altiparanae* (*Aalti*) como grupo externo.

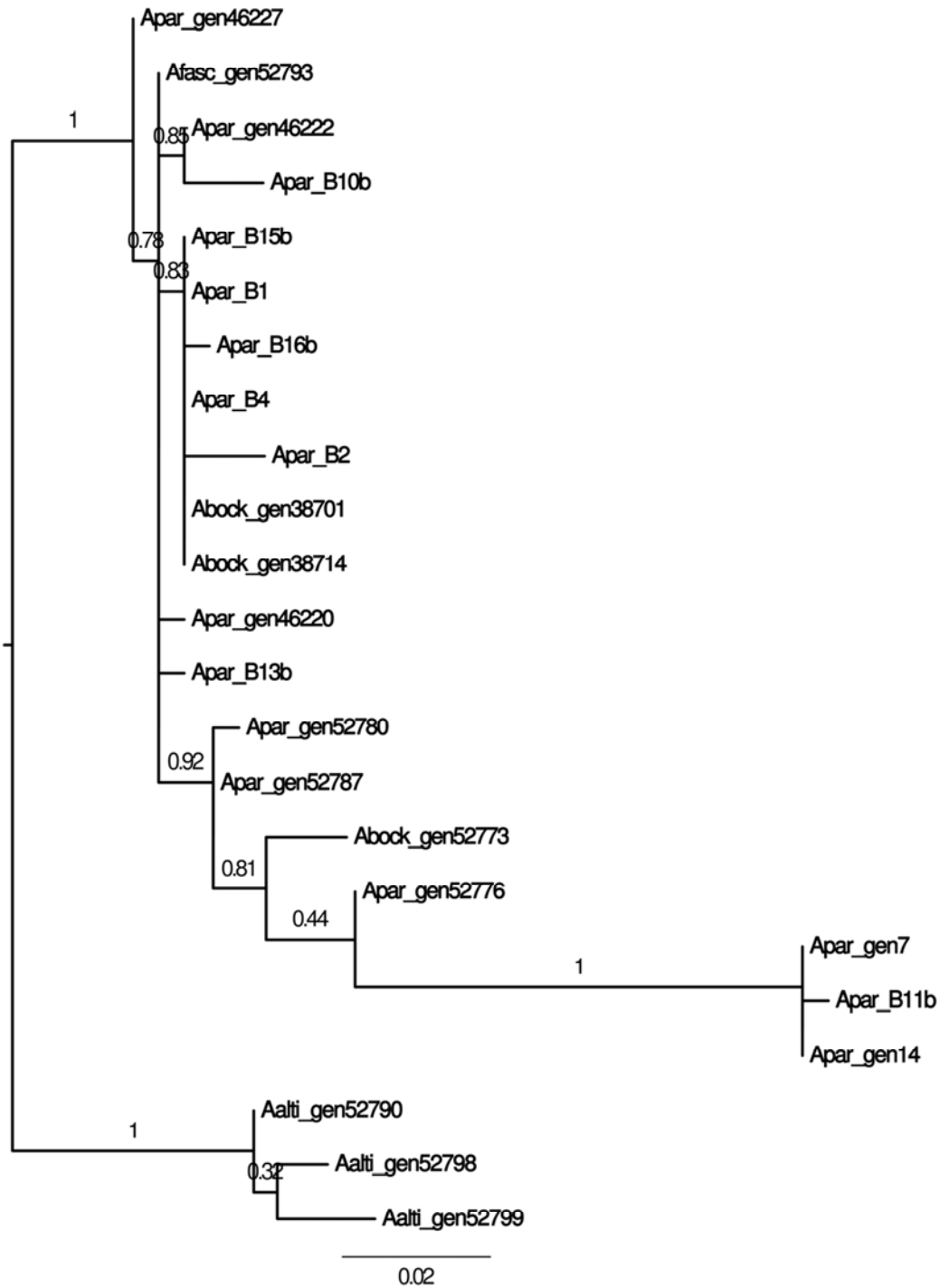


Figura S2 Árvore de máxima verossimilhança construída com as sequências do gene para a histona H1 obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados (Apar_B), gDNA de indivíduos 0B de *A. paranae* (Apar_gen), gDNA de espécimes de *A. fasciatus* (Afasc), com *A. altiparanae* (Aalti) como grupo externo

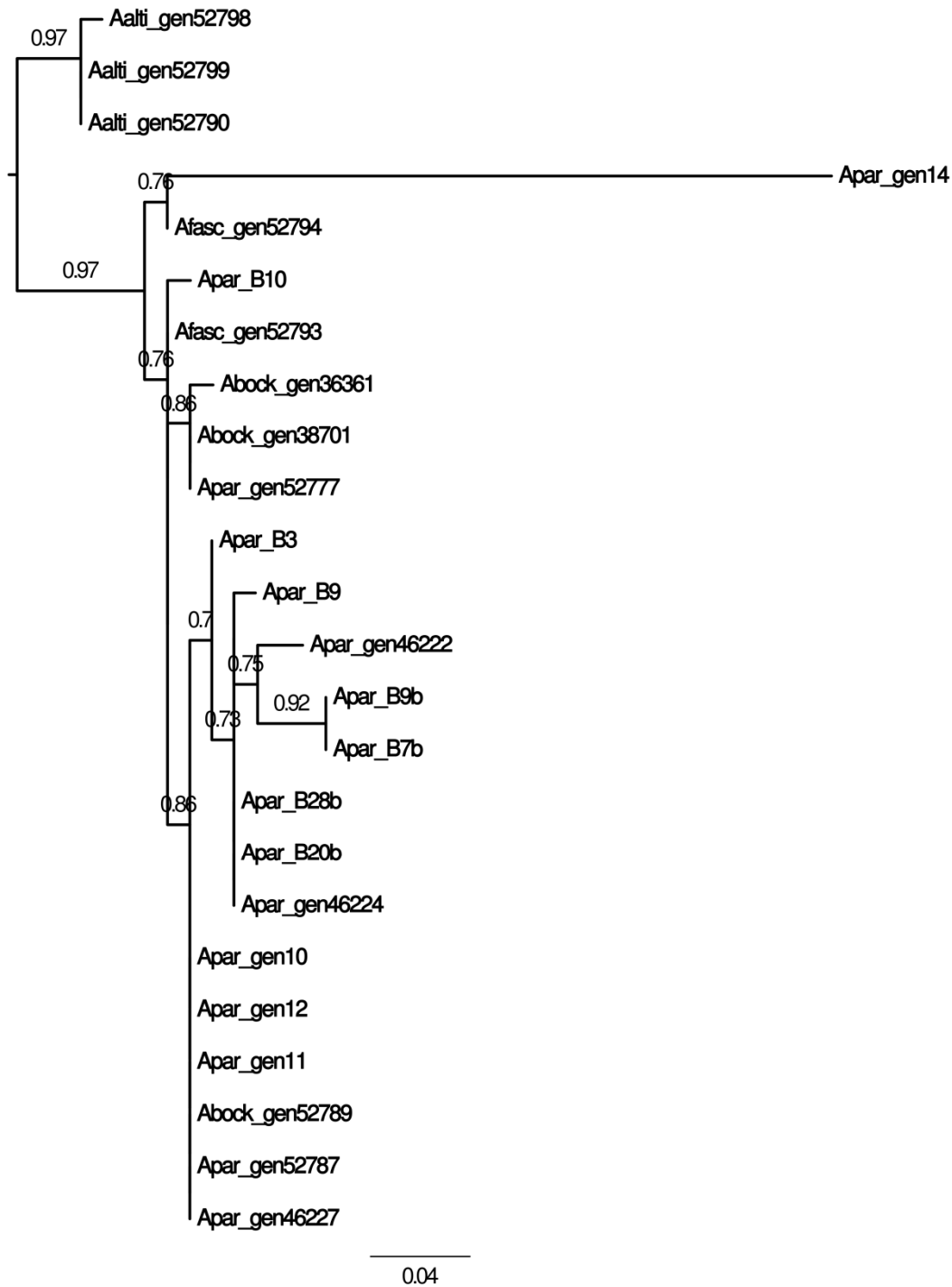


Figura S3 Árvore de máxima verossimilhança construída com as sequências do gene para a histona H3 obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados (Apar_B), gDNA de indivíduos 0B de *A. paranae* (Apar_gen), gDNA de espécimes de *A. fasciatus* (Afasc), com *A. altiparanae* (Aalti) como grupo externo.

5. Considerações Finais

O desenvolvimento deste trabalho forneceu um panorama das relações dos componentes moleculares dos cromossomos B com os cromossomos do complemento A de *A. paranae*, além de apresentar o mapeamento físico das sequências de vários DNAs repetitivos e de elementos transponíveis nos cromossomos dos representantes deste grupo. Os dados obtidos resultaram em novas informações a respeito da origem e composição dos cromossomos B em peixes e permitem apontar que sequências repetitivas de DNA presentes nos cromossomos do complemento normal A estão diretamente ligadas a processos de formação de cromossomos supranumerários em *Astyanax*. Devido presença do DNAr 18S e da histona H1 identificados no cromossomo B foi possível delimitar a origem do cromossomo B de *A. paranae* a dois cromossomos do complemento A que portam estes genes, os pares 2 e 23. Se for assumida a origem a partir do par 2, deve ser considerada a perda do DNAr 5S mapeado neste cromossomo, e que não foi identificado no cromossomo B. Já a hipótese de origem a partir do par 23 é mais parcimoniosa, uma vez que este cromossomo possui sequências para o gene da histona H1 na região proximal e do DNAr 18S na região distal, o que poderia explicar a disposição destes genes no cromossomo B. Entretanto, a ausência de sequências para as histonas H3 e H4 no cromossomo B, mas que foram identificadas em sintonia com a histona H1 nos cromossomos 2 e 23 do complemento normal, também necessita de melhor explicação. Um cromossomo A muito similar (par 24) foi sugerido como ancestral para o cromossomo B grande de *A. scabripinnis* (Mestriner *et al.* 2000), o que sugere a possibilidade de origem comum para o cromossomo B nessas duas espécies.

A pintura cromossômica revelou que existe uma grande homologia dos braços do cromossomo supranumerário metacêntrico (Bm) entre si. Em associação a este fato, a presença de sítios de DNAr 18S e *clusters* de sequências de histona H1 em posições simétricas nos braços do cromossomo Bm permitem inferir que este constitui-se, de fato, um isocromossomo. O acúmulo de sequências do gene para histona H1 no braço maior do cromossomo Bsm e a conservação da posição do DNAr 18S nas suas extremidades indica que este elemento deve ter se originado provavelmente a partir de uma inversão pericêntrica ocorrida no cromossomo Bm.

A análise das sequências do gene para histona H1 obtidas do μ B-DNA sugere que estas sequências estão sob pressão de seleção relaxada de seleção no cromossomo B. Estes dados poderiam explicar o acúmulo de sequências para a histona H1 no cromossomo B. A partir das sequências do ITS foi possível verificar que o μ B-DNA surgiu, provavelmente, do próprio genoma da espécie *A. paranae*.

O presente estudo demonstrou de forma satisfatória que a análise profunda do material genético que compõe os cromossomos B, tanto em nível citogenético quanto molecular, pode responder questões relativas a diversos aspectos relacionados a estes cromossomos enigmáticos. Ao longo de muitos anos os cromossomos B do gênero *Astyanax* foram alvo de diversos estudos. No entanto, somente com o surgimento de técnicas de citogenética molecular avançadas como a FISH e a microdissecção cromossômica foi possível explorar com maior precisão as semelhanças entre estes cromossomos e os cromossomos do complemento A. Sem dúvida, a aplicação do sequenciamento de nova geração (NGS), cada vez mais acessível, poderá esclarecer aspectos ainda não solucionados com a aplicação das técnicas aplicadas até o momento. O NGS permite a obtenção de uma infinidade de dados a um custo operacional muito menor que o de outras técnicas, permitindo uma abordagem quantitativa robusta na

análise do material explorado. A busca nos cromossomos B, a partir do NGS, por DNAs repetitivos, transposons, genes de cópia única e marcadores moleculares B-específicos, pode ser facilitada pela quantidade imensa de dados gerados. A partir disso, é possível mapear fisicamente as sequências encontradas e realizar ensaios envolvendo indivíduos portadores dos cromossomos B, abrindo novas perspectivas no estudo destes interessantes e intrigantes elementos genômicos.

6. Referências

- Ahrabi SM, Farajnia S, Rahimi-Mianji G, Saheb SM, Nejati-Javaremi A: Whole genome amplification: Use of advanced isothermal method. *African Journal of Biotech.* 9:9248-9254 (2010)
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410 (1990).
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-284 (2006).
- Bakkali M, Camacho JPM: The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. III. Mutation rate of B chromosomes. *Heredity* 92:428-433 (2004).
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A: Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *Plant Cell* 25(7): 2536 (2013).
- Bertaco VA, Lucena CAS: Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology* 4(1):53-60 (2006).
- Bertollo LAC, Takahash CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet.* 1:103-120 (1978).
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC: Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PLoS ONE* 8(6): e66532. doi:10.1371/journal.pone.0066532 (2013).

- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA *et al.*: DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). Chromosome Res. 15: 315-325 (2007).
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, Andreenkova OV, Rubtsov NB: Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). Cytogenet Genome Res. 106: 284-288 (2004).
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Pyatkova MS *et al.*: B chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir (Orthoptera, Acrididae) analyzed by chromosome microdissection and FISH. Folia Biol Krakow 51: 1-11 (2003).
- Camacho JPM. B Chromosomes. In: Gregory TR editor: The evolution of the genome. Elsevier, San Diego p 223-286 (2005).
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW: B chromosome evolution. Phil Trans R Soc B Biol Sci 355: 163-178 (2000).
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL: B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). Journal of Fish Biology 72:1907-1932 (2008).
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T *et al.*: Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. The Plant Cell 19: 1738-1749 (2007).
- Cheng YM, Lin BY: Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. Genetics 164: 299-310 (2003).
- Cole CJ, Levans CR: Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. Herpetol. Rev. 3: 102 (1971).
- Colgan D, McLauchlan A, Wilson G, Livingston S: Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Aust J Zool. 46:419-43 (1998).

- Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti F: Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes), *Caryologia* 65(3): 229-233 (2012).
- Darlington CD: Misdivision and the genetics of the centromere. *J Genet* 37: 341-364 (1939).
- Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Nuikawa N: Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Hum. Genet.* 89:13-17 (1992).
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS: Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111:332-340 (2002). doi: 10.1007/s00412-002-0214-4
- Eigenmann CH: Some results from studies of South American fishes. IV. New genera and species of South American fishes. *Indiana University Studies*, 20: 44-48 (1914).
- Fantinatti BE, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins, C: Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica* 139: 273-82 (2011).
- Fernandes CA, Martins-Santos IC: Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124: 301–306 (2005).
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA: Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107-114 (1989).
- Foresti F, Toledo-Filho AS, Almeida-Toledo, LF: Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31: 134-141 (1981).

- Goodwin SB, Ben M'Barek S, Dhillon B, Wittenberg AHJ, Crane CF, et al.: Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genet* 7(6): e1002070 (2011).
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV *et al.*: The proto-oncogene *C-KIT* maps to canid B chromosomes. *Chromosome Res.* 13: 113-122 (2005).
- Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP: Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res* 12: 143-151(2004).
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O: New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* 59(3):307-321 (2010).
- Hashimoto DT, Voltolin TA, Paes ADNVA, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F: Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). *Comp Cytogen* 6(2): 141-151 (2012). doi: 10.3897/CompCytogen.v6i2.1769
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F: Chromosome mapping of H1 histone and 5S RNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei: Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 134: 64-71 (2011).
- Hashimoto DT, Porto-Foresti F: Chromosome polymorphism and heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop ichth* 8: 861-866 (2010).
- Heled J, Drummond AJ: Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular biology and evolution* 27(3):570–580 (2010).
- Henning F, Trifonov V, Almeida-Toledo LF: Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genet Mol Biol.* 31(suppl): 279-283 (2008).

- Henning W, Huijser P, Vogt P, Jacklel H, Edstrom J: Molecular cloning of microdissected lampbrush loop DNA sequences of *Drosophila hydei*. The EMBO Journal 2(10): 1741-1746 (1983).
- Hewitt GM: Grasshoppers and crickets. In: Animal Cytogenetics, Vol. 3, Insecta 1. Gebrüder Borntrager, Berlin-Stuttgart (1979).
- Hizume M, Shibata F, Maruyama, Kondo T: Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. Chromosoma 110: 345-351 (2001). doi: 10.1007/s004120100149
- Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015 (1980).
- Huang D, Wu W, Zhou Y, Hu Z, Lu L: Microdissection and molecular manipulation of single chromosomes in woody fruit trees with small chromosomes using pomelo (*Citrus grandis*) as a model. Construction of single chromosomal DNA libraries. Theor Appl Genet 108:1366-1370 (2004). doi: 10.1007/s00122-003-1550-3.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón M, Ruiz-Rejón C, Parker JS: Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. Chromosoma 104: 113-120 (1995).
- Jones RN, Houben A: B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? Trends Plant Sci 8:417-423 (2003).
- Jones RN: B-chromosome drive. Am. Nat. 137, 430–442 (1991).
- Jones RN: Are B chromosomes selfish? In The evolution of genome size (ed.T. Cavalier-Smith), pp. 397–425. London: Wiley (1985).
- Jones RN, Rees, H: Genotypic control of chromosome behavior in rye XI. The influence of B chromosomes on meiosis. Heredity 22: 333-347 (1967).

- Kao F: Chromosome Microdissection and Microcloning in Human Molecular Genetics. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 13(4):375-380 (1987).
- Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A: High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytologist* 199: 550–558 (2013).
- Leach CR, Houben A, Bruce F *et al.*: Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171: 269–278 (2005).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220 (1964).
- Librado P, Rozas J: DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452 (2009).
- Long H, Qi ZX, Sun XM *et al.*: Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *J. Integr Plant Biol.* 50: 183–189 (2008).
- López-León MD, Cabrero J, Pardo MC, Viseras E, Camacho JPM, Santos JL: Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 71: 352–362 (1993).
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C: R- and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 22(2): 201-204 (1999).
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF: Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87: 101-106 (1992).
- Maluszynka J, Schweizer D: Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity* 62:59-65 (1989).

- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H *et al.*: X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chrom Res.* 12:767-776 (1989).
- Marques A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S *et al.*: B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. *Annals of Botany* (2013). doi:10.1093/aob/mct121.
- Marques A, Klemme S, Guerra M, Houben A: Cytomolecular characterization of *de novo* formed rye B chromosome variants. *Molecular Cytogenetics* 5:34 (2012).
- Martins CCC, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Campos LAO, Costa MA: Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie* 44:75-81 (2013).
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM *et al.*: Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar. *PNAS* 109(33): 13343-13346 (2012).
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM: Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics* 1:24-28 (1992).
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM: Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9 (2000).
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD: A fungal gene antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254(5039): 1773-1776 (1991). doi: 10.1126/science.1763326
- Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC: Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127: 249-253 (1997).

- Montoya-Burgos JI: Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12:1855–1867 (2003).
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC: B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae) An overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 106: 230-234 (2004). doi: 10.1159/000079292.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC: Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 66: 59–64 (2001).
- Moreira-Filho O, Bertollo LCA: *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Brazil J Genet* 14: 331-357 (1991).
- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108: 211–215 (2000).
- Nur U: Maintenance of a 'parasitic' B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics* 87: 499–512 (1977).
- Nur U: Harmful B chromosomes in a mealy bug population. *Genetics* 54: 1225–1238 (1966).
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS: Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochemist*. 35:81–100 (2009).
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HÁ, Toledo-Filho SA; Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. brasil. Genet* 11: 577-624 (1988).
- Östergren G: Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot Notiser* 2: 157–163 (1945).

- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F: Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in Characidium (Characiformes, Crenuchidae). *Genetica* 141(1-3):1-9 (2013).
- Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E: Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics Cell Genetics*. 67:31-36 (1994).
- Perfectti F, Werren JH: The interspecific origin of B chromosome: Experimental evidence. *Evolution* 55(5):1069-1073 (2001).
- Pineau P, Henry M, Suspène R *et al.*: A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol*. 22:582-588 (2005).
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci* 83: 2934-2938 (1986).
- Pirrota V, Jackle H, Edstrom JE: Microcloning of Microdissected Chromosome Fragments. *Genetic Engineering* 8:1-17 (1983).
- Plowman AB, Bougourd SM: Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72: 587–593 (1994).
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C: The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genetics* 11:1 (2010). doi:10.1186/1471-2156-11-1
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F: Estimated frequency of B-chromosomes and population density B chromosome in of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazil J Genet* 20: 377-380 (1997).
- Rocon-Stange EA, Almeida-Toledo LF: Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Braz. J. Genet.* 16: 601-615 (1993).

- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV *et al.*: Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res.* 106: 289-294 (2004).
- Ruiz-Estévez M, López-León M, Cabrero J, Camacho JPM: Ribosomal DNA is active in different B chromosome variants of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica* 141: 337-345 (2013).
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM: B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS ONE* 7(5): e36600 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0036600
- Salvador LB, Moreira-Filho O: B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) *Heredity* 69: 50-56 (1992).
- Sandery MJ, Forster JW, Macadam SR, Blunden R, Jones N, Brown SDM : Isolation of a Sequence Common to A- and B-Chromosome of Rye (*Secale cereale*) by Microcloning. *Plant Molecular Biology Reporter* 9(1):2-30 (1991).
- Saunders RDC, Glover DM, Ashburnerl M *et al.*: PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Research* 17(22):9027-9037 (1989).
- Scalenghe F, Tusco E, Edstrom JE, Pirotta V, Melli ML: Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 82: 205-216 (1981)
- Serrano EA : Origens dos cromossomos B em espécies de *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae) baseada em pintura cromossômica, sequências de rDNA e Histonas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2013; 107p.

- Sharbel TF, Green DM, Houben A: B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41: 14-22 (1998).
- Stitou S, Díaz de la Guardia R, Jiménez R, Burgos M: Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res* 8: 305–311 (2000).
- Sumner, AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75: 304-306 (1972).
- Tamura K., Dudley J, Nei M., Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599 (2007).
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM: B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119: 217-225 (2010).
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM: Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria* *Chromosome Research* 17: 11-18 (2009a).
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM: Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res* 125: 286–291 (2009b).
- Trask BJ: Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet.* 7:149-154 (1991).
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, O'Brien PCM, Perelman PL, Yang F, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS: Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biology* 11:90 (2013).

- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI, Graphodatsky AS: Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosome Res* 10: 109-116 (2002).
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF: New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica* 139: 1073–1081 (2011). doi: 10.1007/s10709-011-9611-z.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM: Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Cell Genet* 74: 70–75 (1996).
- Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M: The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol* 16: 1427-1438 (1999).
- Volff JN, Körting C, Scharl M: Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol* 17: 1673-1684 (2000).
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD: DNA Barcoding of Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1847-1857 (2005).
- Werren JH, Stouthamer R: PSR (paternal sex ratio) chromosomes: the ultimate selfish genetic elements. *Genetica* 117: 85–101 (2003).
- Werren JH, Nur U, Eickbush DG: An extrachromosomal factor causing loss of paternal chromosomes. *Nature* 327: 75–76 (1987).
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and amplications*. Academic, San Diego. 1990, pp 315-322.

- White MJD: Animal Cytology and Evolution. 3rd ed. London: Cambridge University Press (1973).
- Yang F, O'Brien PCM, Milne BS *et al.*: A complete comparative chromosome map for the dog, red fox and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 62: 189-202 (1999).
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S *et al.*: B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genet* 7(8): e1002203 (2011). doi:10.1371/journal.pgen.1002203
- Yudkin DV, Trifonov VA, Kukekova AV, Vorobieva NV, Rubtsova NV, Yang F, Acland GM, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky S: Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 116: 100-103 (2007).
- Zhou Q, Hong-mei Z, Quang-fei, Zhao L, et al.: Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. *BMC Genomics* 13: 109 (2012).
- Zhou Y, Wang H, Wei J, Cui L, Deng X, Wang X, Chen Z: Comparison of Two PCR Techniques Used in Amplification of Microdissected Plant Chromosomes from Rice and Wheat. *BioTechniques* 28:766-774 (2000).
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M: The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res* 11: 23-35 (2003).