



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**MAPEAMENTO FÍSICO E ESTRUTURA MOLECULAR DOS
CROMOSSOMOS B EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Characidium* (CHARACIFORMES,
CRENUCHIDAE)**

Érica Alves Serrano Freitas

Botucatu / SP
Dezembro de 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Érica Alves Serrano Freitas

**MAPEAMENTO FÍSICO E ESTRUTURA MOLECULAR DOS
CROMOSSOMOS B EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Characidium* (CHARACIFORMES,
CRENUCHIDAE)**

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Botucatu / SP

Dezembro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Freitas, Érica Alves Serrano.

Mapeamento físico e estrutura molecular dos cromossomos B em espécies do gênero Characidium (Characiformes, Crenuchidae) / Érica Alves Serrano Freitas. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Fausto Foresti
Capes: 20204000

1. Cromossomos. 2. Characidium - Genética. 3. DNA.
4. Mapeamento cromossômico.

Palavras-chave: Characidium; Conteúdo de DNA; Cromossomos B; Origem; Sequenciamento massivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fausto Foresti, um exemplo como pessoa e profissional, sempre disponível e aberto para o “novo”. Obrigada pela oportunidade e com tanto carinho ser orientada.

Ao amigo e técnico Renato Devidé, pelo auxílio sempre que requisitado, e principalmente pela amizade e alegria que proporcionou.

Ao professor Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação ao trabalho.

Aos amigos do laboratório André, Bruno, Camila, Cris, Felipe, Guilherme, Najila, Priscilla, Silvana, Vivi, pelo companheirismo e ajuda no laboratório e fora dele.

Ao professor Dr. Juan Pedro Martinez Camacho, pelos valiosos ensinamentos e contribuições para a realização deste trabalho, e por me receber com carinho em seu laboratório durante meu período em Granada.

Aos amigos Ricardo, Duílio e Paco, que de forma dedicada e paciente contribuíram para as análises bioinformáticas e discussões deste trabalho.

Às minha queridas amigas Fabilene, Giovana, Maria Lígia e Vanessa que alegraram os dias no laboratório e fora dele. Obrigada por serem amigas presentes e por tudo que fizeram mim.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Aparecida e Donizete, agradeço pela dedicação á mim. Vocês nunca duvidaram da minha capacidade, e sempre embarcaram em minhas “loucuras”. Com certeza grandes responsáveis por este trabalho. Obrigado pelo amor que me deram e ensinaram. Amo muito vocês.

À minha querida irmã Keli e meu cunhado André. Vocês são exemplo de amor, dedicação e perseverança. Obrigada por confiarem e me ajudarem sempre.

À minha “segunda” família: Márcia, Bia, Gustavo, Laine, Thiago e meus sobrinhos amados Lucas, Rafaela e Lívia (que está chegando). Vocês são presentes que ganhei 5 anos atrás e somaram mais amor em minha vida. Obrigada pelo apoio e confiança.

Aos amigos irmãos da Igreja Presbiteriana Jardim Paraíso, agradeço pelo carinho em que me acolheram, pelas orações feitas por mim e pelo Diogo, e pelos momentos tão

divertidos que passei com vocês, principalmente com todos do coral. “Existem amigos mais chegamos que irmãos”.

Ao marido Diogo que com carinho, atenção e muita paciência se esforçou para conhecer esse “tal” cromossomo B comigo durante esses quatro anos. Não há como mensurar sua contribuição para meu doutorado e na vida. Obrigada por fazer mais leves os dias que pareciam tão pesados e mais felizes os dias em que comemoramos. Te amo.

E, principalmente a Deus por dar a minha família, as pessoas que amo, e porque de forma inacreditável tem feito o “impossível” se tornar possível em minha vida.

Resumo

Cromossomos B são componentes aparentemente dispensáveis encontrados nos genomas de inúmeras espécies, compostos basicamente de sequências repetitivas de DNA. Dentre uma variedade de questões a respeito destes elementos, a busca pelo conhecimento de sua origem e de possíveis funções tem sido amplamente estudada. Em peixes, a ocorrência destes cromossomos já foi relatada em cerca de 60 espécies, incluindo espécies do gênero *Characidium*, no qual estes elementos aparentam não ter uma origem única. Com o objetivo de investigar a origem e conteúdo molecular dos cromossomos B em *Characidium*, foram analisadas duas espécies, *Characidium gomesi* e *Characidium alipioi*, portadoras de cromossomos B, utilizando a combinação de técnicas citogenéticas moleculares, análises de sequências e sequenciamento massivo do DNA. Os resultados obtidos mostraram que i) em ambas as espécies os cromossomos B tiveram origem intraespecífica; no entanto, em *C. alipioi* a origem se deu forma independente em relação aos cromossomos B de outras duas espécies do gênero e, deste modo, parecem não compartilhar os mesmos cromossomos ancestrais; ii) em *C. gomesi* as duas variantes compartilham sequências de DNA repetitivo, sendo que cinco delas encontram-se distribuídas nos cromossomos do complemento A, bem como nos cromossomos B, Z e W, enquanto um está restrita aos cromossomos B e Z e W, reforçando a hipótese de origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais; iii) os cromossomos supranumerários em *C. alipioi* provavelmente surgiram a partir do par submetacêntrico 19 de cromossomos autossômicos; iv) cromossomos B em *C. alipioi* parecem ter se tornado um cenário propício para o acúmulo de sequências de DNA repetitivo após seu surgimento; e v) a sequência para o gene da histona H3 isolada dos cromossomos do complemento A e do cromossomo B de *C. gomesi* apresentou idêntica composição de aminoácidos, e as taxas de dN/dS foram menores para aquelas provenientes do genoma B, sugerindo a existência de uma seleção positiva e possível transcrição das cópias também no elemento supranumerário. Os resultados obtidos reforçam a importância da integralização de abordagens citogenéticas estruturais e moleculares para a compreensão de questões relacionadas à biologia evolutiva dos cromossomos supranumerários, uma vez que permitiram ampliar o conhecimento sobre a estrutura, composição e origem dos cromossomos B entre os representantes do gênero *Characidium*. Tais observações também reforçam a proposição deste grupo de peixes como um modelo interessante de estudos sobre a origem e estrutura destes elementos

genômicos, bem como das estratégias evolutivas apresentadas pelos cromossomos supranumerários nos peixes.

Abstract

B chromosomes are apparently dispensable components found in the genomes of many species, mainly composed of repetitive DNA sequences. These elements have been reported in approximately 60 fish species, including the genus *Characidium*, in which these elements do not appear to have a single origin. In order to investigate the origin and molecular content of B chromosomes in *Characidium*, we analyzed two species bearing B chromosomes, *Characidium gomesi* and *Characidium alipioi*, using a combination of molecular cytogenetic techniques, DNA sequence analysis and massive sequencing. Our results showed that i) the B chromosomes of both species had an intraspecific origin, but from different chromosomes; ii) the two B-variants of *C. gomesi* share the same repetitive DNA sequences, five distributed on the elements of the A set, and on B and ZW chromosomes, and one restricted to B and ZW chromosomes, reinforcing its origin from the sex chromosomes; iii) the supernumerary in *C. alipioi* probably arose from the chromosomes of the submetacentric pair 19; iv) B chromosomes in *C. alipioi* became a conducive setting for repetitive DNAs accumulation after its emergence; v) the sequence of H3 histone gene isolated from the chromosomes of the A set and B chromosomes of *C. gomesi* presented identical aminoacid sequences and the rates of dN/dS were lower for those from the B genome, suggesting the action of a positive selection and possible transcription of the supernumerary copies. The results reveals the importance of multiple approaches of chromosomal and molecular methods to understand issues related to evolutionary biology of supernumerary chromosomes, once allowed to increase knowledge about the structure, composition and origin of B chromosomes in representatives of the genus *Characidium*. These observations reinforce the proposition of this fish group as an interesting model for studies on the origin and structure of these genomic elements and the evolutionary strategies presented by supernumerary chromosomes in fish.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Considerações sobre cromossomos B	1
1.2	Metodologias aplicadas ao estudo de cromossomos B	2
1.3	Cromossomos B no gênero <i>Characidium</i>	5
2	Objetivos.....	7
3	Materiais e Métodos	8
3.1	Material	8
3.1.1	Espécies estudadas e locais de coleta	8
3.2	Métodos.....	8
3.2.1	Estimulação de mitoses	9
3.2.2	Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos.....	9
3.2.3	Coloração convencional com Giemsa	11
3.2.4	Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C).....	11
3.2.5	Extração de DNA genômico.....	12
3.2.6	Análise do DNA mitocondrial.....	12
3.2.7	Obtenção e marcação das sondas compostas por DNA repetitivo	12
3.2.8	Microdissecção e obtenção de sondas cromossômicas	13
3.2.8.1	Microdissecção.....	13
3.2.8.2	Kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4).....	14
3.2.8.3	WGA3 – Reamplificação e marcação.....	15
3.2.9	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	15

3.2.10	Sequenciamento total do genoma de <i>C. gomesi</i>	16
3.2.11	Amplificação do material microdissecado	17
3.2.12	Purificação dos fragmentos de DNA	17
3.2.13	Clonagem.....	17
3.2.13.1	Identificação dos clones de interesse.....	18
3.2.14	Sequenciamento nucleotídico (Sanger)	19
3.2.15	Análises bioinformáticas	20
3.2.15.1	Aplicação do Programa RepeatExplorer	20
3.2.15.2	Extração do DNA satélite CG1 dos <i>reads</i> Illumina.....	20
3.2.15.3	Análises nucleotídicas.....	21
3.2.16	Estudos Cariotípicos	21
4	Resultados e Discussão.....	23
4.1	Capítulo I – Análises citogenéticas e sequenciamento massivo avaliam o conteúdo e origem dos cromossomos B em <i>Characidium gomesi</i> (Characiformes, Crenuchidae).....	24
4.2	Capítulo II – Origem dos cromossomos B em <i>Characidium alipioi</i> (Characiformes, Crenuchidae) e sua relação com cromossomos supranumerários de outras espécies do gênero <i>Characidium</i>	55
5	Considerações finais	69
6	Referências bibliográficas	71

1. Introdução

1.1 Considerações sobre os cromossomos B

Grande parte do genoma dos eucariotos não codifica proteínas, sendo chamado de DNA não codificador. Alguns estudos, contudo, demonstraram que este DNA aparentemente inerte pode eventualmente ser funcional e estar envolvido em complexos reguladores, questionando a visão do gene como centro do genoma (Houben et al. 2014; Pennisi, 2012). Nesse sentido, os cromossomos B ou supranumerários constituem um interessante exemplo deste tipo de DNA considerado dispensável. Estes cromossomos são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão A e já foram encontrados em cerca de 15% das espécies de organismos eucariontes. Aparentemente não são essenciais ao ciclo de vida dos organismos hospedeiros; além disso, não possuem homologia com outros elementos do complemento cromossômico normal das espécies e, desta forma, não desenvolvem o processo de emparelhamento com os demais cromossomos durante a meiose. Eles podem ser encontrados com frequência variável em organismos diploides e poliploides não só entre diferentes populações como também podem variar inter- e intraindividualmente. Por não apresentarem herança Mendeliana, estão sujeitos à ocorrência de instabilidade mitótica e meiótica e de processos de deriva (Jones et al. 1991).

De forma geral, cromossomos supranumerários são considerados não funcionais por serem compostos basicamente de sequências de DNA repetitivo, entre os quais DNA ribossômico, DNA centromérico e telomérico, de sequências repetitivas diversas, além de elementos móveis (Camacho, 2005). Como resultado, estes elementos genômicos seguem seu próprio caminho evolutivo e sua composição de DNA pode ser compartilhada ou diferir daquela encontrada nos componentes do complemento genômico padrão da espécie. Por não apresentarem aparentemente nenhuma vantagem para o organismo portador, eles podem ser considerados parasitas genéticos, elementos egoístas que persistem nas populações, utilizando a maquinaria genética que garante a manutenção dos cromossomos do complemento A (Camacho, 2005; Houben et al. 2014). Contudo, esta questão tem dado motivo para interessantes controvérsias nos últimos anos.

Em contraste com a visão predominante de que cromossomos B não portam genes ativos, alguns efeitos fenotípicos têm sido associados com a sua presença. No fungo

Nectria haematococca estes cromossomos podem carregar genes que lhe confere resistência a antibióticos (Miao et al. 1991). E no ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* dentre vários genes identificados no cromossomo B, três deles possuem expressão confirmada (Valente et al. 2014). Estudos como estes revelam a importância da obtenção de dados que subsidiem o conhecimento do conteúdo molecular destes elementos genômicos, uma vez que hoje pode ser confirmada a existência de cromossomos B portando genes ativos.

Questões a respeito da origem dos cromossomos supranumerários surgiram praticamente com a sua primeira visualização nos organismos e ainda permanecem sem uma resposta conclusiva para a maioria dos sistemas de cromossomos B já identificados. Usualmente, considera-se que os cromossomos B são derivados dos cromossomos do complemento A, num processo em que estes elementos se desenvolvem a partir de elementos genômicos da própria espécie identificando-se com um processo de origem intraespecífica, ou a partir de cromossomos provenientes de espécies próximas, quando o processo de origem é determinado de interespecífico (Banaei-Moghaddam et al. 2015). A origem intraespecífica dos cromossomos B tem sido demonstrada em milho (Lamb et al. 2005; Peng et al. 2011), em gafanhotos (Teruel et al. 2010), centeio (Martis et al. 2012) e em peixes (Mestriner et al. 2000; Silva et al. 2013; Valente et al. 2014; Utsunomia et al. 2016). Por outro lado, casos em que os cromossomos B parecem ter surgido por hibridação interespecífica foram reportados em plantas do gênero *Coix* (Sapre & Deshepande, 1987), no peixe *Poecilia formosa* (Schartl et al. 1995) e na vespa *Nasonia vitripennis* (McAllister & Werren, 1997).

1.2 Metodologias aplicadas ao estudo de cromossomos B

Devido à sua ocorrência generalizada na natureza, abrangendo representantes de diferentes grupos biológicos e às suas propriedades enigmáticas, os cromossomos B se apresentam como interessantes sistemas experimentais para resolver uma variedade de questões em citogenética molecular e biologia de populações (Jones, 1991). Estudos intensivos têm sido realizados sobre a possível função destes elementos genômicos, incluindo desde a análise da sua distribuição nas espécies, passando por investigações sobre sua estrutura, origem, modo de transmissão, dinâmica populacional, evolução e até sobre sua possível integração com os componentes do complemento genômico A. No entanto, o conhecimento sobre a composição e estrutura molecular destes elementos, assim como sua origem em diferentes espécies ainda pode ser considerado bastante

restrito, se comparado à sua vasta ocorrência em diferentes organismos (Baneimoghaddam et al. 2015; Bugrov et al. 2007; Camacho et al. 2000).

Embora o conteúdo de DNA destes elementos ainda seja conhecido apenas para um pequeno grupo de organismos, alguns estudos recentes utilizando técnicas mais resolutivas como a microdissecção cromossômica, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e sequenciamentos de nova geração (NGS) têm permitido a caracterização das sequências de DNA repetitivo e de genes de cópia única nos cromossomos B (Houben et al. 2014; Makunin et al. 2014). Estudos que visam à obtenção destas informações têm se revelado importantes, uma vez que a composição dos cromossomos B tem sido usada para elucidar aspectos sobre sua origem (Ruiz-Ruano et al. 2016; Silva et al. 2013; Teruel et al. 2010; Utsunomia et al. 2016, Valente et al. 2014), quando se considera que os cromossomos B ainda deveriam ser portadores de muitos fragmentos de DNA do seu cromossomo ancestral (Martis et al. 2012; Valente et al. 2014).

A técnica de microdissecção cromossômica, quando aplicada em estudos destinados à investigação dos cromossomos B, pode fornecer informações sobre a estrutura molecular e dados de sequências que podem ajudar a esclarecer a origem destes cromossomos (Bugrov et al. 2003). Até o momento, a utilização dos cromossomos inteiros como sondas em experimentos de pintura cromossômica é o método mais empregado em estudos evolutivos, com resultados obtidos em organismos das mais distintas ordens (Long et al. 2008; McQuade et al. 1994; Pansonato et al. 2014; Sharbel et al. 1998; Teruel et al. 2009; Trifonov et al. 2002). Devem ser destacados os estudos realizados em *Locusta migratoria*, em que a combinação do uso da técnica de amplificação de sequências repetitivas obtidas a partir do material genético de cromossomos B microdissecados e o seu mapeamento cromossômico, caracterizaram-se como um estudo pioneiro ao utilizar uma abordagem eficaz em demonstrar o cromossomo ancestral responsável pela origem do supranumerário existente nesta espécie (Teruel et al. 2010). Em peixes, a utilização deste tipo de abordagem também apresentou resultados interessantes, conforme observado em *Astyanax paranae*, em que análises de sequências de histonas e DNA ribossômico obtidas a partir do cromossomo B, quando comparadas àquelas existentes em indivíduos sem cromossomos B, corroboraram com a ideia de origem intraespecífica do supranumerário nesta espécie (Silva et al. 2014).

Recentemente, a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido aplicada de modo eficaz às pesquisas dos cromossomos B de diferentes organismos, fornecendo novas informações a respeito da composição do DNA e da possível origem destes cromossomos (Martis et al. 2012; Ruiz-Ruano et al. 2016; Utsunomia et al. 2016; Valente et al. 2014; Yoshida et al. 2011). Os dados obtidos têm mostrado que o conteúdo dos cromossomos B se apresenta como uma mistura complexa de diferentes tipos de sequências de DNA, incluindo os tipos já conhecidos de DNA repetitivo, muitas inserções de DNA organelar e muitas sequências de pseudogenes e de genes de cópia única, que podem estar ativas (Banaei-Moghaddam et al. 2013; Martis et al. 2012; Trifonov et al. 2013; Valente et al. 2014). Em estudos realizados em centeio foram observadas sobreposições de sequências de tamanho maior encontradas no cromossomo B com aquelas dos cromossomos A 3R e 7K, juntamente com milhares de sequências curtas aparentemente derivadas de todos os cromossomos do complemento A. Os dados obtidos permitiram inferir que o cromossomo B de centeio se originou a partir de múltiplos cromossomos do complemento A, provavelmente por eventos de duplicação parcial do genoma, hibridações interespecíficas e rearranjos cromossômicos (Martis et al. 2012; revisão em Banaei-Moghaddam et al. 2015). Em outro caso, detalhado no estudo do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, este tipo de abordagem permitiu verificar a existência de transcritos de DNAr derivados de diferentes variantes do cromossomo B (Ruiz-Estévez et al. 2012, 2013 e 2014).

Apesar da expressiva ocorrência de cromossomos B em peixes (Oliveira et al. 2009), o uso de tecnologias avançadas que visem a um conhecimento mais aprofundado com relação à origem, conteúdo gênico e evolução destes elementos ainda é pouco relatado entre os componentes deste grupo de organismos, podendo ser relacionados os estudos realizados e disponíveis até o momento em *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al. 2014) e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Utsunomia et al. 2016). Em estudo recente para a espécie de peixe *A. latifasciata*, os autores isolaram diversas sequências gênicas alocadas nestes cromossomos através do sequenciamento total do genoma de indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B. Os dados obtidos permitiram concluir que estes elementos tiveram uma origem comum nas espécies de ciclídeos do Lago Vitória a partir de um fragmento autossômico sendo que, posteriormente, sequências de diversas localidades genômicas foram invadindo este cromossomo (Valente et al. 2014). Já em *M. sanctaefilomenae*, a utilização de técnicas de citogenética molecular, análises de sequências nucleotídicas e NGS permitiram sugerir que a origem dos cromossomos

B se deu a partir do par cromossômico nº 6 e resultou na presença atual de duas variantes; no entanto, a origem destas variantes de supranumerários encontradas nesta espécie ocorreu de forma independente (Utsunomia et al. 2016).

1.3 Cromossomos B no gênero *Characidium*

O gênero de peixes *Characidium* está inserido na subfamília Characidiinae (Crenuchidae) e é constituído por cerca de 70 espécies (Eschmeyer 2015), apresentando uma ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá (*C. marshi*) até a Argentina (*C. rachovii*) (Buckup 2003). Dentre as espécies de peixes portadoras de cromossomos B, aquelas pertencentes ao gênero *Characidium* compreendem um grupo particularmente interessante para estudos citogenéticos e moleculares, uma vez que apresentam uma distribuição diferencial de sequências repetitivas de DNA (Machado et al. 2011; Pansonato-Alves et al. 2011, 2014; Scacchetti et al. 2015; Vicari et al. 2008), sistema de heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo do tipo ZZ-ZW (Centofante et al. 2001, 2003; Maistro et al. 1998, 2004; Noletto et al. 2009) e a ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a e 2011b; Scacchetti et al. 2015).

A presença de cromossomos B foi caracterizada em algumas espécies do gênero como em *Characidium* cf. *zebra* (Miyazawa & Galetti Jr, 1994; Venere et al. 1999), *C. oiticicai* e *C. pterostictum* (Pansonato et al. 2010), *C. gomesi* (Pansonato et al. 2011) e em *Characidium* aff. *vidali* (Scacchetti et al. 2015), com os cromossomos supranumerários apresentando diferentes níveis de heterocromatinização (Pansonato-Alves et al. 2010 e 2011b). Em *Characidium* cf. *alipioi*, estudos ainda não publicados também identificaram a presença de cromossomos B acrocêntricos e totalmente heterocromáticos. Embora estes elementos ocorram em diversas espécies deste gênero, deve-se destacar a escassez de trabalhos que utilizem ferramentas moleculares mais avançadas, visando ao melhor conhecimento do conteúdo molecular destes cromossomos neste grupo de peixes.

Enquanto os cromossomos relacionados ao sexo aparentam ter uma origem única e comum em *Characidium*, os cromossomos B provavelmente tiveram sua origem de forma independente em diferentes espécies deste grupo. Neste sentido, o cromossomo B de *C. oiticicai* teria se originado de modo interespecífico, enquanto que em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, estes elementos parecem ter uma origem intraespecífica, a partir dos cromossomos sexuais (Pansonato-Alves et al. 2014). Recentemente, a homologia

molecular destes elementos em *C. gomesi* foi confirmada por seu comportamento bivalente durante a prófase meiótica em indivíduos portadores de dois cromossomos B (Serrano et al. 2016).

Os resultados obtidos até o momento abrem perspectivas interessantes de investigação sobre os cromossomos B no gênero *Characidium* e caracterizam este grupo de organismos como um modelo potencialmente favorável para estudos que permitam uma visão mais detalhada da composição molecular e dos mecanismos envolvidos na origem e evolução destes elementos genômicos. Neste sentido, o presente trabalho envolveu a utilização de técnicas de citogenética clássica que incluíram a identificação dos padrões de heterocromatina pelo bandamento-C, microdissecção, pintura cromossômica e hibridação *in situ* fluorescente, bem como de citogenética molecular, com amplificação por PCR, clonagem, sequenciamento de Sanger e sequenciamento pela plataforma Illumina, complementadas com análises de bioinformática, com o objetivo de se obter evidências físicas da presença de sequências de DNA repetitivo nos cromossomos supranumerários e também sobre as diferenças nucleotídicas resultantes do processo de diferenciação ao qual estas sequências foram submetidas nestes elementos. Desta forma, o presente estudo visou principalmente à obtenção de resultados mais significativos a respeito da origem e evolução dos cromossomos supranumerários em espécies do gênero *Characidium*.

2. Objetivos

O presente projeto 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), visando aumentar o conhecimento sobre a estrutura molecular dos cromossomos supranumerários e os possíveis mecanismos de origem e evolução destes elementos genômicos em espécies do gênero *Characidium*.

Nesse sentido, o presente projeto teve como objetivos específicos:

- a) verificar a possível existência de compartilhamento de sequências entre os cromossomos B, bem como entre cromossomos B e cromossomos do complemento A em espécies do gênero *Characidium*, utilizando a técnica de pintura cromossômica;
- b) conhecer o conteúdo molecular dos cromossomos supranumerários em espécies do gênero *Characidium* através do mapeamento físico de sequências repetitivas e posterior amplificação daquelas alocadas nos supranumerários a partir destes cromossomos microdissecados;
- c) buscar marcadores citogenéticos e moleculares compartilhados entre os cromossomos do complemento A e cromossomos B, de forma a comparar as sequências encontradas e isoladas dos cromossomos B com aquelas amplificadas do genoma A de indivíduos sem cromossomos extras, visando obter informações sobre a origem dos cromossomos supranumerários;
- d) caracterizar o conteúdo genômico de indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B em *C. gomesi*, buscando identificar marcadores moleculares de DNA repetitivo presentes nestes cromossomos.

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

Foram analisados exemplares de duas espécies de peixes do gênero *Characidium*, *C. gomesi* e *C. alipioi* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, conforme indicado na Tabela 1. Amostras de *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. pterostictum*, *C. zebra* e *C. lanei* também foram utilizadas para as análises de sequências nucleotídicas e/ou produção de sondas específicas. De cada indivíduo foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares. Os animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras, conforme permissão para coleta emitida pelo MMA/IBAMA/SISBIO de número 3245. Os procedimentos de coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com o regulamento internacional de experimentos com animais, seguido pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP número de protocolo 304).

Tabela 1: Exemplares de espécies do gênero *Characidium* analisados.

Espécie	LBP	Localidade	Cromossomos B	Coordenadas
<i>C. gomesi</i>	16908	Cachoeira Véu de Noiva/ Botucatu-SP	0-6	S 22° 59' 25" W 48° 25' 40"
<i>C. alipioi</i>	22287	Rio Ribeirão Grande/ Pindamonhangaba-SP	0-4	S 22°49' 00.3" W 45° 25' 23.7"

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses proposto por Cole & Leavens 1971, com algumas adaptações. As preparações cromossômicas diretas foram obtidas a partir de células renais, segundo o protocolo proposto por Foresti et al. (1981 e 1993) e a identificação dos padrões de heterocromatina constitutiva foi realizada segundo o protocolo de Sumner (1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH proposta por Pinkel et al. (1986) para a localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e 18S, snRNA U2, histona H3, e sequências de DNA satélite CG1, CG2, CG5, CG10, CG12,

CG14, CG16, CG22, CG30, CG53, CG55, CG56, CG58, CG59, CG62, CG63, CG65 e CG67, bem como para a pintura cromossômica dos elementos supranumerários microdissecados.

3.2.1 Estimulação de Mitoses

Com o objetivo de se obter um maior índice mitótico nas preparações, foi utilizada a técnica de injeção prévia nos animais de uma solução de fermento biológico, conforme descrito por Cole & Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Oliveira et al. (1988a) para peixes.

O procedimento utilizado consistiu 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 dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado, por cerca de 48 horas.

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

3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu os protocolos propostos por Foresti et al. (1981) e por Foresti et al. (1993), com algumas adaptações, dependendo das condições de tamanho e de bem estar dos animais. Essa metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão *in vitro*, seguindo-se à fixação das células pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consistiu em:

Protocolo 1: Preparação “in vivo” - Foresti et al. (1981)

- 1) anestesiar o animal em solução de benzocaína a 0,01%;
- 2) injetar intraperitonealmente uma solução de colchicina 0.016% na proporção de 1ml/100g de peso do animal. Deixar a animal nadando livremente por 40 minutos;
- 3) sacrificar o animal retirando fragmentos de tecido da porção anterior do rim e colocando os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6ml de solução hipotônica (KCl 0,075M);

- 4) dissociar o material na placa, procurando obter uma suspensão homogênea de células; transferir, então, o material da placa de Petri para um tubo de centrífuga e deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 20 minutos;
- 5) retirar a suspensão celular da estufa e adicionar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura e deixá-la em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 6) adicionar cerca de 6ml de fixador à suspensão e novamente agitar levemente a mistura;
- 7) centrifugar a suspensão a 1000rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante, ressuspender o precipitado em 6ml de fixador e centrifugar por 7 minutos a 1000rpm;
- 8) repetir o item anterior por duas vezes. Após a última centrifugação, preparar a suspensão final, mais concentrada;
- 9) gotear a suspensão celular em lâminas limpas, deixar secar, efetuar a coloração com Giemsa a 5% e observar ao microscópio;

A suspensão pode ser armazenada para uso futuro. Neste caso, a suspensão é centrifugada retirando-se o sobrenadante, ressuspendendo em 0,5 a 1ml de fixador e armazenando a -3°C, para uso comum ou em metanol e armazenando a -20°C, para uso na microdissecção.

Protocolo 2: Preparação “in vitro” - Foresti et al. (1993)

- 10) anestésiar o animal em solução de benzocaína a 0,01%;
- 11) sacrificar o animal, retirando fragmentos de tecido do rim anterior. Transferir o material para uma pequena placa de vidro contendo 10ml do meio de cultura RPMI previamente aquecido em estufa a 37°C;
- 12) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur até a obtenção de suspensão celular homogênea e colocar em tubo de centrífuga de 10ml;
- 13) adicionar à suspensão celular 2 gotas de solução de colchicina a 0,01% com auxílio de uma seringa de 1ml e levar à estufa a 37°C por 30 minutos;
- 14) centrifugar a 1000rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante;
- 15) acrescentar 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C e levar a estufa a 37°C por 21 minutos;

- 16) retirar o frasco da estufa e adicionar 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 17) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000rpm) por 10 minutos;
- 18) gotear 2 gotas do material em lâminas de vidro;
- 19) deixar secar ao ar.

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

3.2.3 Coloração convencional com Giemsa

As preparações cromossômicas depositadas nas lâminas passaram pelo seguinte processo de coloração:

- 1) hidrolisar o material contido na lâmina em HCl 1N a 60°C por cerca de 3 minutos;
- 2) lavar com água destilada, à temperatura ambiente e corar com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos;
- 3) lavar com água destilada, deixar secar e observar ao microscópio.

3.2.4 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

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

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

3.2.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo preservadas em etanol de indivíduos não portadores e portadores de cromossomos B das espécies *C. gomesi* e *C. alipioi*, além de *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. pterostictum*, *C. zebra* e *C. lanei* utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante.

3.2.6 Análise do DNA mitocondrial

A amplificação e sequenciamento parcial dos genes Cytochrome oxidase C subunit1 (COI) e Cytochrome B gene (Cyt B) foi realizada para identificação dos exemplares. Os *primers* utilizados foram Cyt B L 14841 (5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA -3') e Cyt B H 15915b (5'- AAC CTC CGA TCT TCG GAT TACAAG AC -3') (Kocher et al. 1989) para o Cyt B e COI L6252-Asn (5'- AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G -3') e H7271-COXI (5'- TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTC TTT T -3') para o COI (Melo et al, 2011). As sequências foram inicialmente analisadas pelo programa Geneious Pro v8.05 e o alinhamento foi feito com o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). As distâncias médias entre as sequências foram calculadas utilizando o “*pairwise deletion*” pelo software MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

3.2.7 Obtenção e marcação das sondas compostas por DNA repetitivo

As sequências para DNAr 5S e 18S, histona H3 e snRNA U2 foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico de representantes que não apresentaram cromossomos B (0B). As sequências para DNAr 5S e 18S foram amplificadas utilizando-se os *primers* 5SA (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') e 5SB (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA-3') (Pendás et al. 1995), 18S6F (5'-CTC TTT CGA GGC CCT GTA AT-3') e 18S6R (5'-CAG CTT TGC AAC CAT ACT CC-3') (Utsunomia et al. 2016). Para a amplificação do gene para a histona H3 foram utilizados os seguintes *primers*, H3F (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3') e H3R (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC-3') (Colgan et al. 1998). O gene snRNA U2 foi amplificado pelos *primers* U2F (5'-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-3') e U2R (5'-TCC CGG CGG TAC AAT TGC A-3'). Sondas de oligonucleotídeos contendo sequências dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (GAG)₁₀ foram marcadas diretamente com TAMRA durante a síntese pela Sigma, como descrito por Kubat et al. (2008). Foram obtidas também sondas de dezoito DNAsats utilizando os *primers* descritos na Tabela Suplementar 1 do Cap. 1. As reações foram realizadas

para um volume final de 25 μ l, utilizando 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 1 μ l de *Taq* DNA buffer (20mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50mM KCl); 0,5U de *Taq* polimerase (Life Technologies); 0,1 μ M de cada *primer* e 50ng de DNA genômico.

3.2.8 Microdissecção e obtenção de sondas cromossômicas

A microdissecção foi realizada em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado em um microscópio Zeiss Axiovert 100. Foram microdissecados dez cromossomos B de cada espécie, a partir da preparação citogenética de exemplares de *Characidium alipioi*, *C. gomesi* e *C. oiticicai* portadores de apenas um cromossomo extra para efetuar a pintura cromossômica, sendo as sondas nomeadas como CgB para *C. gomesi*, CaB para *C. alipioi* e CoB para *C. oiticicai*. Também foram microdissecados dez cromossomos B de exemplares portadores de três cromossomos extras para utilização do material microdissecado em ampliações e sequenciamento de DNA de *C. gomesi*.

3.2.8.1 Microdissecção

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica seguiram o protocolo proposto por Mühlmann et al. (1995), com adaptações e consistiram em:

- 1) diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador metanol: ácido acético, na proporção 3:1, respectivamente;
- 2) pingar a suspensão em lamínulas, secar ao ar e corar com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,06M e Na₂HPO₄ 0,449M, pH 6.8) durante 5 minutos;
- 3) lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar;
- 4) 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 uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf);
- 5) depositar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR contendo a solução diluidora.

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

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

Passo 1 – Fragmentação

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

Passo 2 – Preparação da Biblioteca

Para a preparação da biblioteca adicionar ao tubo de PCR 2µl de Single Cell Library Preparation e 1µl de Library Stabilization Solution. A amostra é colocada em termociclador a 95°C por 2 minutos e, em seguida adiciona-se 1µl de Library Preparation Enzyme, sendo, então, a amostra colocada em termociclador e submetida às seguintes condições:

16°C ----- 20 min
 24°C ----- 20 min
 37°C ----- 20 min
 75°C ----- 5 min
 12°C --- manutenção

Passo 3 – Amplificação

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

25 ciclos { 95°C ---- 3 min
 94°C ---- 30 seg
 65°C ---- 5 min
 12°C ---- manutenção

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

3.2.8.3 WGA3 – Re-amplificação e Marcação

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

14 ciclos	{	95°C ---- 3 min
		94°C ---- 15 seg
		65°C ---- 5 min
		12°C ---- manutenção

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

3.2.9 Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

O mapeamento em cromossomos metafásicos das sondas do gene para histona H3, DNAr 18S e 5S, snRNA U2, CgB e DNAsats em *C. gomesi*, bem como para histona H3, DNAr 18S e 5S, snRNA U2, CgB, CaB e CoB em *C. alipioi* foi realizado por hibridação *in situ* fluorescente, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100µg/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 à temperatura ambiente.

Depois de fixado o material, 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, o material das lâminas foi desnaturado em formamida 70% a 70°C por 5 minutos e desidratado em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação do material das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC

e água) contendo de 3 a 6µL de sonda marcada, por 10 minutos a 100°C. Posteriormente, 15µL 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 o material das lâminas foi lavado 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foi realizada nova lavagem por 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 50µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30µL de solução de bloqueio com anticorpo (24µL de solução de bloqueio e 6µL de anti-digoxi-rodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). Todas as lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.2.10 Sequenciamento total do genoma de *C. gomesi*

Visando à busca de sequências repetitivas localizadas nos cromossomos B de *C. gomesi*, o DNA genômico de dois indivíduos fêmeas, sendo um sem cromossomos B (OB) e outro portador de 4 cromossomos B (4B) foi sequenciado na plataforma Illumina HiSeq2500, produzindo 2x125bp de leituras *paired-end*. Uma vez que as fêmeas possuem um par de cromossomos heteromórficos identificados como Z e W, todos os tipos de sequências presentes no genoma da espécie foram representados.

Em estudos recentes foi demonstrado que o sequenciamento de baixa cobertura do genoma de uma planta ou animal (<1x) foi suficiente para a identificação e caracterização da maior parte das diversas famílias de DNA repetitivo da espécie, utilizando o método de análise *graph-based* (Macas et al. 2007; Ruiz-Ruano, comunicação pessoal). Sabe-se que *Characidium gomesi* (chamado anteriormente de *C. cf. fasciatus*) tem um *C-value* de aproximadamente 1,19pg (Carvalho et al. 1998). Assim, segundo a fórmula de Dolezel et al. (2003), estima-se que o genoma completo de *C. gomesi* tenha cerca de 1,163Gb [(0,978x10⁹)x1,87(pg)]. Do modo como foi

efetuado, o sequenciamento foi realizado para obtenção de 1Gb de dados, o que corresponde a aproximadamente 1x de cobertura do genoma.

3.2.11 Amplificação de DNA a partir de material microdissecado e DNA genômico

A partir da biblioteca de cromossomos B microdissecados de *C. gomesi*, foram amplificados fragmentos correspondentes à região parcial codificante do gene para a histona H3, do DNAr 5S e do DNA satélite CG1, bem como foram amplificados fragmentos correspondentes à região parcial codificante destes genes a partir do genoma OB de *C. gomesi*, *C. zebra*, *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lanei*, *C. lauroi* e *C. alipioi*, para posterior clonagem e sequenciamento. Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose.

3.2.12 Purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o “GFXTM PCR and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences), de acordo com as orientações do fabricante. Tal procedimento é realizado recortando-se as bandas do gel de agarose e colocando-as num tubo de 0,5ml, às quais são adicionados 10µl de *capture buffer* para cada 10mg de gel. A seguir, o material é misturado no vortex e incubado a 60°C, mexendo a cada 5 minutos, até que a agarose se dissolva totalmente, quando a agarose dissolvida é centrifugada brevemente, sendo o conteúdo transferido para a coluna GFX. Incubar por um minuto em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar por 1 minuto a 16.000rpm. Descartar o líquido que passou pela coluna para o tubo coletor e recolocar a coluna GFX novamente no mesmo tubo coletor. Adicionar 500µl de wash buffer à coluna GFX e centrifugar por 1 minuto a 16.000rpm. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna GFX para um tubo estéril de microcentrífuga de 1,5ml. Secar a coluna GFX para evitar a presença de álcool e deixar 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionar sobre a coluna 50µl de água MilliQ autoclavada, incubar por 2 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar por 1 minuto a 16.000rpm para recolher o DNA purificado. Descartar a coluna GFX e armazenar no freezer os fragmentos de DNA recuperados.

3.2.13 Clonagem

As amostras de DNA isoladas do gel de agarose foram ligadas ao plasmídeo pGEM®-T (Promega) para posterior transformação de células competentes de

Escherichia coli DH5 α (Gibco.Brl Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. Em um tubo de 0,5ml, adicionar 3 μ l do inserto de interesse (fragmento de DNA), 1 μ l de T4 DNA ligase, 5 μ l de tampão de reação 2x e 1 μ l do plasmídeo pGEM-T (54ng/ μ l). Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12 a 16 horas.

Descongelar as células competentes em gelo, aliquotar 50 μ l destas células competentes e transferir para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, mantendo em gelo. Recolocar o restante das células competentes em freezer -70°C. Adicionar 4 μ l do produto de ligação (inserto-plasmídeo) ao tubo contendo os 50 μ l de células competentes, misturando cuidadosamente com uma micropipeta e manter o tubo em gelo por 30 minutos. Após este tempo, aplicar um choque térmico de 20 segundos em banho-maria a 37°C, colocar o tubo imediatamente em gelo e manter por 2 minutos. Adicionar ao tubo 950 μ l de meio líquido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%) à temperatura ambiente e agitar a 225 rpm por uma hora a 37°C.

O produto deve, então, ser centrifugado por 10 segundos a 14.000rpm e descartada parte do sobrenadante. A seguir, espalhar 150 μ l do produto de transformação em placas de Petri estéreis contendo meio sólido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, ph 7,5), contendo 2 μ l de ampicilina (50mg/ml) por mililitro de meio LB e 50 μ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside) (50mg/ml). Incubar as placas *overnight* a 37°C com o meio voltado para baixo. As colônias brancas devem ser transferidas para tubos de 15ml contendo 4ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina, utilizando-se de palitos ou ponteiras de micropipeta autoclavados.

Os tubos com as bactérias devem ser mantidos *overnight* sob agitação de 300rpm a 37°C. Transferir 0,8 ml do meio com as bactérias para tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo aproximadamente 200 μ l de glicerol estéril. O material é, então, homogeneizado e armazenado a -70°C.

3.2.13.1 Identificação dos clones de interesse

Os clones de interesse são identificados por meio de reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o plasmídeo. A reação foi feita num volume total de 50 μ l (50 pmol de cada *primer* - M13F (5' - 3') AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG e M13R (5' - 3') CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG -, tampão de reação 1x (KCl

50 mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris-HCl 10 mM), 2mM de cada dNTP e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences).

Para a transferência dos clones deve-se encostar um palito estéril sobre a colônia recombinante e mergulhar o palito no tubo de 0,5ml contendo a solução para amplificação. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador PTC-100™ (MJ Research), de acordo com as seguintes condições: um ciclo de 3 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 2 minutos a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Para verificar a efetividade da reação e a amplificação de fragmentos dentro do tamanho esperado, foi realizada a checagem do produto de PCR em gel de agarose 2%.

3.2.14 Sequenciamento nucleotídico (Sanger)

O sequenciamento nucleotídico foi realizado utilizando-se o kit BIG DY Terminator k.3.1 (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Para cada amostra a ser sequenciada foi preparada a seguinte reação: 2µl de pré-mix (kit), 1µl de primer (3,3mM), 40-100ng DNA (volume máximo de 5µl), água estéril (volume necessário para 10µl 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, sendo que os produtos dessa reação foram purificados para eliminação de nucleotídeos terminadores não incorporados. A seguir, foram adicionados 2µl de acetato de sódio 3M e 80µl de etanol 95% em temperatura ambiente em cada tubo contendo o produto da reação de PCR de sequenciamento, sendo, então, misturados no vortex e centrifugados a 20°C por 30 minutos a 14.000g. Em seguida, deve-se remover cuidadosamente o sobrenadante por aspiração e adicionar 400µl de etanol 70% em temperatura ambiente e 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 mês a 4°C protegido de luz.

Ressuspender o *pellet* em 4µl 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 2µl de amostra na corrida de sequenciamento. As sequências obtidas foram lidas em um sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.2.15 Análises de bioinformática

As análises de bioinformática foram realizadas sob orientação do prof. Dr. Juan Pedro Martinez Camacho, da Universidade de Granada, Espanha.

3.2.15.1 Aplicação do Programa RepeatExplorer

Inicialmente, foi realizada a filtragem de qualidade dos *reads* Illumina, com a aplicação do programa Trimmomatic (Bolger et al. 2014), sendo retirados *reads* com menos de 90% de bases com qualidade inferior a Q20. Após a etapa de filtragem, 400.000 pares de *reads* (200.000 *reads* de cada indivíduo) foram selecionados para a etapa de clusterização com o programa RepeatExplorer (Novák et al. 2013), considerando *reads paired-end* e cobertura da clusterização e montagem com tamanhos iguais a 55 e 40pb, respectivamente. Além disso, uma base de dados customizada de sequências repetitivas foi construída utilizando-se o programa RepeatModeler (Smit e Hubley 2010) a partir de dados do genoma de *Astyanax mexicanus* (GenBank accession number APWO000000000.1). Esta base de dados foi utilizada como um complemento para a anotação das sequências de DNA repetitivo em conjunto com a base de dados do RepBase (Jurka et al. 2005).

A base de dados customizada gerou 1.243 sequências, constituídas por 589.736pb e N50=613pb. Após a etapa de clusterização, foi realizada a busca por *clusters* de famílias de DNAs satélites. Posteriormente, foram extraídos e processados manualmente os *contigs* montados utilizando-se o programa Geneious Pro v8.04 para visualizar os gráficos *dotplot* visando detectar repetições *in tandem*. Em seguida, foram extraídos os monômeros presentes em cada *cluster*, os quais foram alinhados para obter a sequência consenso de cada DNAsat e, a partir destas sequências, foram desenhados *primers* para amplificação por PCR inverso das sequências de DNA satélite.

3.2.15.2 Extração do DNA satélite CG1 dos *reads* Illumina

Para se obter um *score* mais confiável e detalhado sobre a abundância haplotípica do DNAsat CG1 nas bibliotecas genômicas de *C. gomesi*, foram extraídos os monômeros diretamente dos *reads* Illumina. Uma vez que os *reads* são menores que o tamanho dos monômeros, os *reads paired-ends* foram juntados utilizando o programa fastq-join (<https://code.google.com/p/ea-utils/wiki/FastqJoin>) com um mínimo de sobreposição de sequências de 6pb. Em seguida, os *reads* do satDNA foram alinhados contra seu respectivo dímero com o *software* RepeatMasker (Smit et al. 2010) utilizado (https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols/blob/master/rm_getseq.py), este um *script*

Python, para extrair apenas a região alinhada. Posteriormente, estas sequências foram mapeadas com o GeneiousPro v8.04 contra o dímero do DNAsat e extraída a região central do alinhamento. Entretanto, nos casos em que não foi possível extrair no mínimo 100 sequências completas do monômero na região central do alinhamento, as sequências foram editadas a fim de se obter mais monômeros completos nesta região utilizando o *script* Python relacionado acima (https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols/blob/master/sat_cutter.py).

3.2.15.3 Análises nucleotídicas

Todas as sequências utilizadas referentes ao gene de histona H3, DNAr 5S e DNAsat CG1 para *C. gomesi* foram inicialmente analisadas no programa Geneious Pro v8.05 e o alinhamento foi realizado utilizando-se o algoritmo Muscle (Edgar, 2004) sob parâmetros pre-definidos.

As análises de diversidade foram realizadas para cada sequência, separando por espécie e tipo de DNA, ou seja, OB PCR, B PCR, 0B *reads* e 4B *reads*, utilizando-se o programa DnaSP (Librado e Rozas. 2009). A montagem de uma árvore de extensão mínima (*minimum spanning tree*) foi realizada a partir dos haplótipos gerados no programa DNAsp. A árvore de extensão mínima foi gerada no programa Arlequin v3.5 (Excoffier e Lischer 2010), considerando-se somente os haplótipos correspondentes a mais de uma sequência. Todas as sequências foram submetidas a uma busca na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) com uso da ferramenta BLASTn (Altschul et al. 1990) para confirmar sua identidade.

Comparações de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS) e não sinônimas por sítios não sinônimos (dN) da histona H3 de cada uma das bibliotecas de *C. gomesi* (B e 0B PCR) foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por pós-testes de Dunn considerando $\alpha=0,05$.

3.2.16 Estudos Cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais, bem como com fluorocromos e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diploide modal resultante da contagem mínima de 25 metáfases cromossômicas por espécime de cada população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram capturadas com *software* Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics) e as imagens das preparações com fluorocromos foram capturadas

separadamente, utilizando filtros UV específicos coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

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

4. Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Characidium* foram organizados na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir, sendo que o segundo capítulo já foi submetido para publicação.

Capítulo 1

Análises citogenéticas e sequenciamento massivo avaliam o conteúdo e origem dos cromossomos B em *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae).

Capítulo 2

Origem dos cromossomos B em *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) e sua relação com cromossomos supranumerários de outras espécies do gênero *Characidium*.

Capítulo 1

Análises citogenéticas e sequenciamento massivo avaliam o conteúdo e origem dos cromossomos B em *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae)

Resumo

Cromossomos B ou supranumerários são elementos considerados como parasitas genéticos, existentes em representantes de diferentes grupos biológicos, compostos principalmente de DNA repetitivo. Dentre uma variedade de questões intrigantes a respeito destes elementos genômicos, o conhecimento sobre sua origem, bem como sobre as possíveis funções que poderiam desempenhar nos organismos portadores tem sido objeto de amplas investigações. Em peixes, a ocorrência de cromossomos supranumerários foi relatada em cerca de 60 espécies, incluindo espécies do gênero *Characidium*, nas quais a origem destes elementos ainda é pouco conhecida. No presente trabalho, foi acessado o conteúdo molecular dos cromossomos B de *C. gomesi*, com a aplicação das técnicas de microdissecção e pintura cromossômica, bem como pelo mapeamento e análise de sequências repetitivas já conhecidas de DNAr 18S e 5S, dos genes para histona H3 e DNAsn U2 e de sequências de DNA satélite (CG1-CG67) obtidas a partir da aplicação da técnica de sequenciamento massivo e de análises bioinformáticas. Os resultados permitiram caracterizar 8 sequências de DNA repetitivo presentes nestes cromossomos incluindo DNAr 5S, histona H3 e 6 DNAsats, dos quais 7 são compartilhadas entre os cromossomos do complemento A e os cromossomos B. O compartilhamento de sequências entre as duas variantes de cromossomos B aponta para sua origem comum. Os cromossomos heteromórficos Z e W identificados como relacionados ao sexo são apontados como possíveis ancestrais dos cromossomos B nesta espécie, uma vez que compartilham cinco das 8 sequências de DNA repetitivo mapeadas nos supranumerários. Além disso, as árvores de haplótipos obtidas com sequências de alguns destes marcadores corroboram a hipótese de origem intraespecífica. Apesar de ser mapeado apenas nos supranumerários, o DNAsat CG22 foi encontrado por análises de bioinformática e PCR também nos elementos do complemento A, apontando para sua massiva amplificação nos cromossomos B. Por fim, a sequência do gene para a histona H3 isolada dos cromossomos B e do genoma do complemento A apresentou idêntica sequência de aminoácidos, e as taxas de dN/dS foram menores para aquelas provenientes

do genoma B, sugerindo a ação de uma seleção positiva e possível transcrição das cópias presentes nos supranumerários.

Introdução

Cromossomos supranumerários são componentes dispensáveis do genoma, encontrados em muitas espécies de animais, plantas e fungos. Apesar da vasta distribuição, estes elementos ainda são, em sua maioria, desconhecidos em nível molecular e funcional (Camacho 2005). Usualmente, considera-se que cromossomos B são derivados dos componentes do complemento padrão A, a partir da própria espécie tendo uma origem denominada intraespecífica, ou de espécies próximas, identificando uma origem interespecífica (Banaei-Moghaddam et al. 2015). Por serem dispensáveis, o DNA destes elementos evolui em taxas muito altas, o que dificulta determinar de qual cromossomo A ancestral procedeu-se sua origem, quer seja a partir da própria espécie ou de uma espécie diferente. Neste sentido, poucos trabalhos conseguiram apresentar conclusões definitivas a respeito (Ruiz-Ruano et al. 2016).

De forma geral, cromossomos supranumerários são considerados não funcionais, uma vez que são compostos basicamente de sequências de DNA repetitivo, entre os quais incluem-se o DNA ribossômico, DNA centromérico e telomérico, além de elementos móveis (Camacho, 2005). No entanto, alguns estudos têm demonstrado a existência de transcritos provindos destes cromossomos (Banaei-Moghaddam et al. 2013; Miao et al. 1991; Ruiz-Estévez et al. 2012; 2013 e 2014; Trifonov et al. 2013; Valente et al. 2014), alterando a proposição de que possam ser considerados apenas como portadores de DNA inerte.

Recentes avanços relacionados à tecnologia de sequenciamento do DNA têm tornado possível investigar a composição, origem e atividade transcricional destes elementos genômicos (Banaei-Moghaddam et al. 2015). Alguns estudos utilizando microdissecção cromossômica, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e sequenciamento de nova geração (NGS) têm permitido a caracterização das sequências de DNA repetitivo e de genes de cópia única nos cromossomos B, bem como ampliar o conhecimento sobre sua origem (Makunin et al. 2014, 2016; Martis et al. 2012; Houben et al. 2014; Utsunomia et al. 2016; Valente et al. 2014; Yoshida et al. 2011). A análise intraespecífica da distribuição do satelitoma nos cromossomos utilizando a tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*) pode ser bastante informativa a respeito das relações espacial e

temporal entre os cromossomos de um mesmo genoma, fornecendo, assim, novas abordagens para uma análise mais precisa da compartimentalização do genoma, tendo por base a localização cromossômica de sequências de DNAsat (DNAs satélites), bem como sobre a origem de elementos genômicos como os cromossomos B, como já observado para gafanhotos (Ruiz-Ruano et al. 2016).

Dentre as espécies de peixes portadoras, *Characidium gomesi* apresenta de 0 a 4 cromossomos B, claramente acrocêntricos e totalmente heterocromáticos quando presentes. Análises de pintura cromossômica e filogenia indicam que os supranumerários em *C. gomesi* possuem uma origem intraespecífica, mais especificamente a partir dos cromossomos sexuais (Pansonato-Alves et al. 2014). A homologia molecular dos supranumerários nesta espécie também foi confirmada por seu comportamento bivalente na prófase meiótica. No entanto, estudos mais aprofundados utilizando novas tecnologias que pudessem permitir o conhecimento do conteúdo de DNA e evolução destes cromossomos em *C. gomesi* ainda não foram realizados. Neste sentido, o presente trabalho envolveu a utilização de técnicas de citogenética clássica como bandamento-C, microdissecção, pintura cromossômica e hibridação *in situ* fluorescente e de técnicas moleculares, como a amplificação por PCR, clonagem, sequenciamento de Sanger, sequenciamento pela plataforma Illumina e análises bioinformáticas, com o objetivo de obter maiores informações sobre a origem e evolução dos cromossomos supranumerários em *C. gomesi*.

Materiais e Métodos

Origem das amostras, análises cariotípicas e extração de DNA

O desenvolvimento experimental envolveu a análise de 24 exemplares de *C. gomesi*, sendo 16 fêmeas e 8 machos capturados na Cachoeira Vêu de Noiva, componente da bacia do Rio Paranapanema, município de Botucatu-SP (S 22° 59' 25" W 48° 25' 40"). Os animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras, conforme permissão para coleta emitida pelo MMA/IBAMA/SISBIO, número 3245. Os procedimentos de coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com o regulamento internacional de experimentos com animais, seguido pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP número de protocolo 304). Os exemplares utilizados foram identificados e depositados na coleção de peixes do

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, São Paulo, Brasil, sob o número 16910.

Para realização das análises citogenéticas, os animais foram anestesiados, dissecados e as preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas seguindo o protocolo proposto por Foresti et al. (1981). O bandamento-C foi efetuado de acordo com a metodologia descrita por Sumner (1972). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critérios estabelecidos por Levan et al. (1964), observando-se a classificação dos cromossomos como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), que foram organizados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho. Para a extração de DNA genômico (DNAg) foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Microdissecção cromossômica e obtenção de sondas

A microdissecção cromossômica foi realizada em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado em um microscópio Zeiss Axiovert 100. Foram microdissecados dez cromossomos B acrocêntricos para amplificação e sequenciamento de DNA e para a produção de sonda. O DNA microdissecado foi colocado em um tubo contendo 9µl de água DNase-free ultrapura e amplificado usando o Kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (wga4-Sigma) (Gribble et al. 2004). Após a amplificação inicial, foi gerada uma sonda de DNA (CgB) marcada com digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) utilizando o Kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification (wga3-Sigma), seguindo o protocolo do fabricante.

Sequenciamento total do genoma e identificação de DNAs satélites

Com a finalidade de buscar sequências repetitivas localizadas nos cromossomos B de *C. gomesi*, foi sequenciado o DNA genômico de dois indivíduos fêmea, sendo um sem cromossomos B (OB) e outro portador de 4 cromossomos B (4B) na plataforma Illumina HiSeq2500, produzindo 2x125bp de leituras *paired-end*. Uma vez que as fêmeas possuem os cromossomos Z e W, todos os tipos de sequências presentes no genoma da espécie foram representados.

Após uma filtragem de qualidade dos *reads* Illumina através do programa Trimmomatic (Bolger et al. 2014), na qual foram retirados *reads* com menos de 90% de bases com qualidade inferior a Q20, foram selecionados 400.000 pares de *reads* (200.000 *reads* de cada indivíduo) para a etapa de clusterização com o programa

RepeatExplorer (Novák et al. 2013), considerando *reads paired-end* e cobertura da clusterização e montagem com tamanhos iguais a 55bp e 40pb, respectivamente. Além disso, uma base de dados customizada de sequências repetitivas foi construída utilizando-se o programa RepeatModeler (Smit e Hubley 2010) a partir de dados do genoma de *Astyanax mexicanus* (GenBank accession number APWO00000000.1), como um complemento para a anotação das sequências de DNA repetitivo em conjunto com a base de dados do RepBase (Jurka et al. 2005).

A base de dados customizada gerou 1.243 sequências, constituídas por 589.736pb e N50=613pb. Após a etapa de clusterização, foi realizada a busca por *clusters* de famílias de DNAs satélites. Posteriormente, foram extraídos e processados manualmente os *contigs* montados utilizando-se o programa Geneious Pro v8.04 para visualizar os gráficos dotplot, visando detectar repetições *in tandem*. Em seguida, foram extraídos os monômeros presentes em cada *cluster*, os quais foram alinhados para obter a sequência consenso de cada DNAsat e, a partir destas sequências, foram desenhados *primers* para amplificação por PCR inverso das sequências de DNA satélite.

Sondas de DNA repetitivo

Sondas para os genes DNAr 18S e 5S, snDNA U2 e histona H3 foram obtidas por PCR a partir do genoma de *C. gomesi*, utilizando *primers* descritos anteriormente (Colgan et al. 1998; Pendás et al. 1995; Pineau et al. 2005; Utsunomia et al. 2016). Também foram obtidas sondas de dezoito sequências de DNAsats utilizando os *primers* descritos na Tabela Suplementar 1. As reações foram realizadas para um volume final de 25ul, utilizando 200uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 1ul de *Taq* DNA buffer (20mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50mM KCl); 0,5U de *Taq* polimerase (Life Technologies); 0,1uM de cada *primer* e 50ng de DNA genômico. Todas as sondas foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP ou biotin-16-dUTP.

Hibridação fluorescente in situ (FISH)

Para os experimentos de FISH, os cromossomos foram tratados de acordo com os procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986), sob altas condições de stringência. As imagens foram capturadas digitalmente usando o software Image Pro plus 6.0 (Media Cybernetics) utilizando filtros adequados do microscópio de epifluorescência (Olympus BX61) equipado com uma câmera Olympus DP70. A composição final das imagens foi realizada com a aplicação do software editor de imagens Adobe Photoshop CS6, utilizando escalas de imagem e tamanho uniformes.

Amplificação de DNA, clonagem e sequenciamento.

Foram amplificados, clonados e sequenciados os genes DNAr 5S, histona H3 e o DNAsat CG1 a partir do DNA dos cromossomos B microdissecados de *C. gomesi* e também do genoma OB de *C. gomesi*, *C. zebra*, *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lanei*, *C. lauroi* e *C. alipioi*. As reações foram realizadas contendo 1X PCR buffer, 1.5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 U de Taq polymerase (Invitrogen), 0.1µM de cada primer e 50ng de gDNA.

O ciclo básico para amplificar estas regiões consistiu na denaturação do DNA a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos a 94°C por 30s, 52 °C por 30s, 72°C por 30s e extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e os fragmentos obtidos de cada amostra foram extraídos do gel e clonados em vetor pGEdo DNA M-T Easy Vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA). O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o Kit Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

Extração do DNAsat CG1 a partir das leituras de Illumina.

Para obter um *score* mais confiável e detalhado sobre a abundância haplotípica do DNAsat CG1 nas bibliotecas genômicas de *C. gomesi*, foram extraídos os monômeros diretamente dos *reads* Illumina. Uma vez que os *reads* são menores que o tamanho dos monômeros, os *reads paired-ends* foram juntados utilizando o programa fastq-join (<https://code.google.com/p/ea-utils/wiki/FastqJoin>) com um mínimo de sobreposição de sequências de 6pb. Em seguida, os *reads* do DNAsat foram alinhados contra seu respectivo dímero com o *software* RepeatMasker (Smit et al. 2010) e utilizado um *script* Python (https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols/blob/master/rm_getseq.py) para extrair apenas a região alinhada. Posteriormente, estas sequências foram mapeadas com o uso do programa Geneious Pro v8.04 contra o dímero do DNAsat e extraída a região central do alinhamento. Entretanto, nos casos em que não foi possível extrair no mínimo 100 sequências completas do monômero na região central do alinhamento, as sequências foram editadas a fim de se obter mais monômeros completos nesta região com a utilização de um *script* Python (https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols/blob/master/sat_cutter.py).

Análise de sequências nucleotídicas

Todas as sequências de DNA foram inicialmente analisadas no programa Geneious versão Pro 4.8.5 criado por Biomatters (<http://www.geneious.com/>) e o alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo Muscle (Edgar 2004) sob parâmetros predefinidos. As análises de diversidade foram realizadas com o programa DnaSP (Librado e Rozas 2009). A montagem das árvores de extensão mínima (*minimum spanning tree*) foi realizada a partir dos haplótipos gerados com o uso do programa DNAsp. Posteriormente, foram geradas árvores no programa Arlequin v3.5 (Excoffier e Lischer 2010) considerando somente os haplótipos correspondentes a mais de uma sequência. Todas as sequências foram submetidas a uma busca na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) com a ferramenta BLASTn (Altschul et al. 1990), para confirmar sua identidade.

Comparações de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS) e não sinônimas por sítios não sinônimos (dN) da histona H3 de cada uma das bibliotecas de *C. gomesi* (B e 0B PCR) foram realizadas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por pós-testes de Dunn, considerando $\alpha=0,05$.

Resultados

Análises cromossômicas

Os exemplares de *Characidium gomesi* analisados apresentaram número diplóide de 50 cromossomos (32m+18sm), com sistema de cromossomos heteromórficos ligados ao sexo do tipo ZW (Figura 1). Adicionalmente, foram observadas células que apresentaram de 0 a 5 cromossomos B acrocêntricos e mitoticamente instáveis em 21 dos 24 indivíduos analisados. Dentre estes exemplares, foi observado um indivíduo portador de 6 cromossomos extras, sendo dois deles submetacêntricos, caracterizando uma variante de cromossomos B (Bsm) até então não observada em *C. gomesi* (Figuras 1d e 2f). O bandamento-C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos, além de um grande bloco pericentromérico no cromossomo Z, sendo os cromossomos B e W totalmente heterocromáticos (Figuras 2b, d, f; 3b, d, f).

Identificação de sequências de DNA satélite

Com o intuito de gerar informações a respeito do conteúdo molecular dos cromossomos B de *C. gomesi*, foi realizada uma busca por sequências de DNA repetitivo a partir das bibliotecas de sequenciamento massivo em exemplares com 0B e 4B. Na primeira “corrida” e filtragem de RepeatExplorer (RE) utilizando os *reads* 0B e 4B foram encontrados 24 diferentes DNAs satélites. Para cada filtragem subsequente, os satélites encontrados eram incorporados a uma base de dados utilizada nas filtrações seguintes e, desta forma, satélites já analisados não eram considerados novamente. Em uma nova “corrida” e filtragem de RE utilizando *reads* 0B e 4B paralelamente, foram detectados 18 novos satélites na biblioteca 0B e 12 na 4B. Após duas novas “corridas” e filtrações utilizando conjuntamente os *reads* 0B e 4B, 8 e 5 satélites foram obtidos, respectivamente. A busca final resultou na obtenção de 67 sequências de DNA satélite (DNAsats CG1 - CG67), dos quais 18 foram utilizados para o desenho de *primers* (Tabela suplementar 1). Após a amplificação por PCR, aqueles DNAsats que apresentaram padrão de escada em gel de agarose foram selecionadas para experimentos de FISH.

De acordo com os resultados da hibridação, foram selecionados 6 DNAsats que apresentaram sítios em ambos os cromossomos A e B, nomeadamente CG1, CG10, CG22, CG30, CG53 e CG55. As características moleculares de cada DNAsat encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

Distribuição de sondas de DNA repetitivo e pintura cromossômica

Dentre as famílias multigênicas mapeadas por FISH, apenas sítios da histona H3 foram encontrados nos cromossomos B (Figura 1c). Quanto às sequências de DNAsats, diferentes cenários puderam ser observados (Tabela 1, Figuras 2 e 3; Tabelas suplementares 2 e 3), sendo que 6 deles (CG1, CG10, CG22, CG30, CG53 e CG55) foram mapeados nos cromossomos B (Figuras 2 e 3). CG1 foi mapeado apenas nos cromossomos B, Z e W; clusters dos DNAsats CG10, CG22, CG30, CG53 e CG55 foram observados nos cromossomos B, Z e W e também em cromossomos do complemento A. Em resumo, 5 DNAsats foram localizados nos cromossomos B e sexuais, sendo que CG1 apresenta distribuição apenas nestes cromossomos (Figura 2a) e CG30 apresentou pequenas marcações em alguns cromossomos A e cluster definidos nos cromossomos sexuais e B, sugerindo a possível origem dos cromossomos supranumerários a partir dos cromossomos sexuais em *C. gomesi*.

Por outro lado, o DNAsat CG22 não foi visualizado por FISH nos cromossomos A, indicando que poderia ser específico dos supranumerários. No entanto, análises bioinformáticas e ampliações por PCR indicam a presença deste satélite em indivíduos 0B. Todos os DNAs repetitivos encontrados nos cromossomos B foram sumarizados em forma de ideograma na Figura 5. A pintura cromossômica com a sonda CgB produziu marcações nos cromossomos B e nos cromossomos do par heteromórfico ZW (Figura 1d), confirmando observações apresentadas em trabalhos anteriores (Pansonato-Alves et al. 2014), bem como nos cromossomos B submetacêntricos, que demonstram que as duas variantes identificadas compartilham sequências de DNA.

Análise das sequências de DNA

Três sequências de DNA repetitivo (histona H3, DNAsat CG1 e o DNAr 5S) foram amplificadas por PCR a partir do cromossomo B microdissecado (B PCR), do genoma 0B de *C. gomesi* (0B PCR) e de diferentes espécies de *Characidium*. Embora não detectado por FISH, foi possível obter o DNAr 5S a partir do DNA dos cromossomos B, o que provavelmente está relacionado à presença destes sítios em número abaixo do limite de sensibilidade da FISH (aproximadamente 1.5Kb). Após a retirada das regiões correspondentes aos *primers*, as sequências do gene para histona H3, DNAr 5S e DNAsat CG1 obtidas por clonagem e extraídas das leituras de Illumina apresentaram tamanhos de 370pb, 97-99pb e 176-194pb, respectivamente. A fim de minimizar o impacto de possíveis erros de PCR e de sequenciamento, foram retirados os “singletons” para a realização das análises.

Dentre os 44 clones analisados, as sequências do gene para histona H3 obtidas dos cromossomos B (B PCR) apresentaram maior diversidade nucleotídica quando comparadas àquelas obtidas do genoma 0B (0B PCR) (Tabela 3). Tanto substituições sinônimas quanto não sinônimas foram encontradas para o gene H3 em ambos os tipos de DNAs (0B e B), sendo que o cálculo de dN para as sequências de cada grupo não revelou diferenças significativas, enquanto o inverso ocorreu para dS, o qual foi quatro vezes maior para as sequências dos cromossomos B (Tabela 4). Notadamente, as taxas de dN/dS das sequências obtidas do genoma 0B foram aproximadamente o dobro em relação as sequências obtidas dos cromossomos B (Tabela 4), sugerindo que uma seleção positiva possivelmente estaria atuando sobre as sequências da histona H3 nos cromossomos B. Adicionalmente, as sequências de aminoácidos entre os dois grupos foram idênticas, o que coincide com as taxas similares de dN e os valores menores de

dN/dS, indicando que estas podem estar potencialmente ativas no cromossomo supranumerário. A *Minimum-spanning tree* construída com as sequências da histona H3 demonstrou que os haplótipos encontrados nos cromossomos B são semelhantes aos dos cromossomos do complemento A de *C. gomesi*. Além disso, estas mostram semelhanças entre si, uma vez que a maioria delas compartilha o mesmo ramo (Figura 6).

Um total de 75 clones foram obtidos para o DNAr 5S. Na *Minimum-spanning tree* foi possível observar que os haplótipos referentes às sequências obtidas do genoma A da maioria das espécies apresentam-se em mais de um ramo, separados por muitas mutações, sugerindo a possibilidade da presença de pseudogenes do DNAr 5S nas análises realizadas no presente trabalho. Por outro lado, os haplótipos identificados nos cromossomos B (B PCR) apresentaram clara similaridade entre si e com aqueles presentes nos cromossomos do complemento A (0B PCR) de *C. gomesi*, com poucas mudanças mutacionais (Figura 7). Este resultado parece indicar o oposto do observado pela análise de diversidade nucleotídica, uma vez que houve maior diversidade para as sequências obtidas dos B (Tabela 3), refletindo, assim, a complexidade na evolução deste gene.

Para o DNAsat CG1 foram sequenciados 94 clones, além de 62 monômeros extraídos das leituras de Illumina (4B reads e 0B reads). A diversidade nucleotídica observada nas sequências obtidas dos cromossomos B microdissecados (B PCR) foi menor que a metade do valor encontrado para o genoma 0B (0B PCR), assim como para as sequências da biblioteca 4B (4B reads), que apresentou menor diversidade em comparação a da biblioteca 0B (0B reads) (Tabela 3). Os reads de Illumina foram alinhados e a *Minimum-spanning tree* construída, considerando a abundância relativa de cada haplótipo, o que refletiu a evolução em concerto deste DNAsat, uma vez que a maioria das variantes se agrupam por espécie, do lado esquerdo os haplótipos de *C. zebra* e do lado direito de *C. gomesi*, sendo que alguns haplótipos de *C. zebra* parecem muito diferentes do restante, indicando que a homogeneização ainda não está completa. Mais uma vez, os haplótipos dos cromossomos B se assemelham entre si e agrupam com aqueles obtidos a partir do genoma 0B e das bibliotecas 0B e 4B de *C. gomesi* (Figura 8).

4.2 Discussão

Até o momento, cromossomos B foram encontrados em 5 espécies do gênero *Characidium* (Maistro et al. 1998; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a e 2011b; Scacchetti et al. 2015). Estudos realizados com base em pintura cromossômica e análises filogenéticas concluíram que enquanto os cromossomos sexuais aparentam ter uma origem única e comum, os cromossomos B provavelmente se originaram de forma independente em diferentes espécies deste grupo de peixes (Pansonato-Alves et al. 2014). No presente estudo, foi acessado o conteúdo molecular dos cromossomos B de *C. gomesi* a partir da análise de diferentes tipos de DNA repetitivo componentes deste elemento, e a comparação das mesmas com aquelas localizadas nos elementos do complemento A permitiram reafirmar a origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais nesta espécie. A amplificação massiva de DNA satélite pouco abundante no genoma A e a presença de um gene para histona possivelmente ativo também foram observados nestes elementos supranumerários. Os resultados obtidos também permitiram descrever uma nova variante de cromossomos B no gênero, no qual até momento havia sido descrita apenas a presença de cromossomos B pequenos e acrocêntricos (Pansonato-Alves et al. 2013; Scacchetti et al. 2015).

Diferentes variantes morfológicas de cromossomos B já foram encontradas em diferentes espécies de peixes, como *Astyanax scabripinnis*, *A. goyacensis*, *Alburnus alburnus*, *Poecilia formosa*, *Prochilodus lineatus*, *Moenkhausia sanctaefilomenae* e *Astatotilapia latifasciata* (Artoni et al. 2006; dos Santos et al. 2013; Foresti et al. 1989; Lamatsch et al. 1992; Nanda et al. 2007; Salvador et al. 1992; Valente et al. 2014), sendo que em gafanhotos da espécie *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero et al. 1999; López-Léon et al. 1993; Ruíz-Estévez et al. 2013) foi descrito o mais complexo sistema de diversificação de cromossomos supranumerários, composto por mais de 50 variantes (Camacho et al. 1997). No caso de *C. gomesi*, as duas variantes de cromossomos B encontradas, nas formas de acrocêntricos e submetacêntricos apresentaram-se heterocromáticas e compartilham as mesmas sequências de DNA repetitivo, em resultados obtidos pela hibridação com as sondas de DNAsats e CgB. Assim, parece parcimonioso concluir que ambas as variantes derivaram de um ancestral comum. De fato, a origem comum para diferentes variantes de cromossomos B parece ser recorrente, conforme observado ocorrer no peixe *Astyanax paranae*. Nesta espécie, os dois tipos de cromossomos B (Bm e Bsm) apresentam homologia de sequências, sendo

dois cromossomos (pares nº 2 e 23) apontados como possíveis ancestrais para as duas variantes (Silva et al. 2013).

Uma primeira questão que surgiu com a descoberta dos cromossomos B e que ainda impulsiona fortemente as investigações sobre estes elementos genômicos refere-se à sua origem. Diversos estudos sugerem que os cromossomos B tiveram sua origem a partir dos cromossomos do complemento A em várias espécies (Bugrov et al. 2003; Matsubara et al. 2008; Ruiz-Ruano et al. 2016; Scudeler et al. 2015; Silva et al. 2013; Teruel et al. 2010; Vicari et al. 2011; Utsunomia et al. 2016; Yoshida et al. 2011;). Considera-se, pois, que eles devem conter regiões gênicas que demonstrem homologia com sequências do complemento padrão. Neste sentido, a obtenção de dados a respeito do conteúdo molecular dos supranumerários tem se revelado um importante instrumento para elucidar aspectos sobre sua origem (Ruiz-Ruano et al. 2016; Silva et al. 2014; Teruel et al. 2010; Utsunomia et al. 2016; Valente et al. 2014).

No presente trabalho, o uso de abordagens integrativas demonstrou ser adequado para explorar o conteúdo de DNA dos cromossomos B em *C. gomesi*, possibilitando o conhecimento de 8 tipos de DNA repetitivo presentes nestes elementos, dos quais, ao menos 7 são compartilhados com os cromossomos A a partir de experimentos de FISH (H3, 5S, CG1, CG10, CG30, CG53 e CG55) e podem auxiliar na elucidação de sua origem. Por outro lado, a sequência do DNAsat CG22 não foi possível de ser visualizada por FISH nos cromossomos A. Tal fato se deve provavelmente à interface entre os níveis genômico e citológico, no qual mesmo presente, o número de repetições e o nível de clusterização desta sequência não seriam suficientes para sua visualização com a aplicação da técnica de FISH, assim como já observado em *Eumigus monticola* e *Locusta migratória* (Ruiz-Ruano et al. 2016a e b). De fato, análises bioinformáticas e ampliações por PCR demonstram a presença de CG22 no indivíduo não portador de cromossomos B. Desta forma, pequenos “arrays” deste DNA satélite estariam dispersos nos elementos do complemento A, inclusive nos cromossomos sexuais, e os cromossomos B seriam um cenário ideal para sua amplificação massiva e formação de clusters, como foi observado.

A similaridade entre cromossomos sexuais e B tem sido revelada em diversas espécies (Camacho, 2000). Em *Characidium*, foi demonstrado a partir de pintura cromossômica e análises filogenéticas que a origem dos cromossomos B se deu de

forma independente a partir dos cromossomos sexuais nas espécies *C. pterostictum*, *Characidium* sp. aff. *C. vidalli* e *C. gomesi*, (Pansonato-Alves et al. 2014; Scacchetti et al. 2015). No entanto, a natureza anônima das sequências de DNA presentes nas sondas obtidas por microdissecção e a alta capacidade de DNAs repetitivos em se espalhar pelos cromossomos, faz com que a informação fornecida seja de alcance limitado no que diz respeito à origem dos supranumerários (López-Flores & Garrido-Ramos 2012; Silva et al. 2016).

Em um trabalho recente, Ruiz-Ruano et al. (2016) utilizaram a técnica de NGS para analisar o satelitoma de *E. monticola* e apontaram a origem do cromossomo B nesta espécie a partir do cromossomo S8, uma vez que estes cromossomos compartilham 6 DNAs satélites. No presente trabalho foi demonstrado o compartilhamento de 5 sequências entre os cromossomos B e os sexuais Z e W (CG1, CG10, CG30, CG53 e CG55), os quais foram caracterizados a partir de dados de NGS e hibridação *in situ* fluorescente. Notavelmente, o DNAsat CG1 apresentou sinais de hibridação semelhantes aos dos resultados obtidos por pintura cromossômica, indicando que a sonda CgB obtida por Pansonato-Alves et al. (2014) estava enriquecida por este satélite. Por essa razão, pode-se inferir e confirmar que os cromossomos supranumerários derivaram dos cromossomos sexuais em *C. gomesi*. Tal afirmação pode ser sustentada pelas *Minimum-spanning tree* obtidas com as sequências da histona H3, DNAr 5S e DNAsat CG1, uma vez que o compartilhamento de haplótipos entre as sequências localizadas nos cromossomos do complemento A e B apontam para uma origem intraespecífica deste elemento. Entretanto, a presença dos genes para histona H3 e DNAr 5S, os quais não são observados por FISH nos cromossomos sexuais, poderiam lançar dúvidas sobre esta hipótese. Uma possível explicação seria que os cromossomos B teriam recebido apenas algumas cópias de sequências destes genes após sua formação. A presença de praticamente todas as sequências pertencentes aos B em um único ramo para os três marcadores (H3, 5S e CG1) parece suportar a possibilidade de que apenas poucas cópias tenham migrado, duplicado e diversificado nos cromossomos B. Também não pode ser descartada a presença destes genes nos cromossomos sexuais em número de cópias abaixo da sensibilidade da técnica de FISH, de fato foi possível amplificar o gene histônico H3 a partir do cromossomo W microdissecados (dados não mostrados).

Cromossomos B portando genes ativos têm sido reportados em algumas espécies de diferentes organismos (Banaei-Moghaddam et al. 2013; Ruiz-Estévez et al. 2012; 2013 e 2014), sobretudo podendo conferir alguns efeitos fenotípicos como no fungo *Nectria haematococca*, (Miao et al. 1991). Em peixes, estudos recentemente realizados em *Astatotilapia latifasciata* confirmaram a presença de ao menos três genes ativos nos cromossomos B (Valente et al. 2014). As sequências para o gene da histona H3 isoladas dos cromossomos do complemento A e do cromossomo B de *C. gomesi* apresentaram idênticas sequências de aminoácidos. Além disso, as taxas de dN/dS foram menores para aquelas provenientes do genoma do B (0,066). Tal situação é divergente das altas taxas de dN/dS observadas para sequências gênicas presentes em cromossomos B de outras espécies, consequência de uma seleção relaxada agindo sobre estes cromossomos “dispensáveis” (Silva et al. 2014; Utsunomia et al. 2016; Teruel et al. 2010). Tais dados parecem sugerir que um processo de seleção positiva está agindo sobre as cópias do gene para a histona H3 no cromossomo supranumerário, podendo assim permitir sua transcrição. Estas observações reforçam as novas teorias de que os cromossomos B podem não ser tão inertes quanto se imaginava.

De fato, a seleção positiva parece exercer um papel importante na fixação de genes duplicados nos genomas (Hughes et al. 1994; Johnson et al. 2001; Kondrashov et al. 2002; Zhang et al. 1998). Tem sido proposto que após a duplicação de genes, suas cópias parálogas são submetidas a dois estágios: i) logo após a duplicação, e na primeira fase de sua evolução, essas cópias são retidas e sujeitas à uma seleção purificadora devido ao processo de regulação da dosagem de proteínas; ii) no segundo estágio de evolução, duplicações gênicas podem ser fixadas no genoma pela seleção positiva e parecem proporcionar uma vantagem a longo prazo, permitindo a criação de novas funções (Kondrashov et al. 2002). Assumindo que uma cópia de H3 tenha migrado para os cromossomos B e sofrido duplicações subsequentes, estas cópias poderiam estar passando pelo segundo estágio de evolução, ou seja, a seleção positiva poderia estar agindo de forma a fixar estas cópias. No entanto, a relativa baixa diferença de dN/dS entre as cópias dos cromossomos do complexo A e dos cromossomos B, bem como a idêntica sequência de aminoácidos, indicam que essas cópias presentes nos B provavelmente estariam no segundo estágio a pouco tempo, sendo que novas funções para estas cópias ainda não teriam sido fixadas.

Os resultados de análises das sequências de H3 criam um paradoxo entre a possível transcrição deste gene e a corrente visão de que regiões Banda-C positivas refletem a inatividade gênica. Deve, contudo, ser destacado que um corpo crescente de evidências tem se acumulado em apoio a um possível papel funcional dentro de diferentes contextos biológicos baseado principalmente na existência de transcrições derivadas de regiões heterocromáticas (Romero-Fernández et al. 2014). De fato, foi encontrado um marcador epigenético (H3K4m) de regiões ativas nos cromossomos B de células meióticas de *C. gomesi*. Contudo, a presença deste marcador não pode ser necessariamente relacionada à transcrição gênica, uma vez que a falta de sinapse observada para um destes cromossomos é extremamente relacionada a ocorrência de silenciamento gênico (Serrano et al. 2016). Desta forma, experimentos que permitam confirmar a presença de transcritos da histona H3 provindos dos cromossomos B se tornam necessários.

Por fim, acreditamos que os próximos passos devem ser destinados a investigar a possível transcrição diferencial destes tipos de DNAsats encontrados nos cromossomos B comparando o transcriptoma de indivíduos 0B e 4B, uma vez que nos últimos anos algumas possíveis funções têm sido sugeridas para esta porção do DNA (Plohl et al. 2006). Também, utilizando o transcriptoma, será realizada uma busca por genes de cópia única presentes nestes cromossomos, visando aumentar o conhecimento do conteúdo genômico dos cromossomos B, assim como sua capacidade transcricional.

Referências

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

Tabela 1. Características moleculares de cada DNAsat resultante de mapeamento nos cromossomos do complemento A e nos cromossomos B em *Characidium gomesi*. A similaridade tem por base o banco de dados de *Astyanax mexicanus*.

Satélite	Tamanho	Densidade cluster	Similaridade	Abundância
CG1	182pb	0,20	DNA.TcMar.Tc1 (0,0185%)	4B (0,604%)/0B (0,413%)
CG10	143pb	0,37	-	4B (0,102%)/0B (0,0105%)
CG22	103pb	0,54	-	4B (0,0453%)/0B (0%)
CG30	281pb	0,14	-	0B (0,082%)
CG53	177pb	0,11	-	4B (0,034%)
CG55	62pb	0,47	RC.Helitron (0,968%)	4B (0,173%)/0B (0,147%)

Tabela 2. Sumário dos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de satDNA.

Família de DNAsat	Tamanho	Localização cromossômica			
		B	Z	W	A
CG1	180pb	+	+	+	-
CG2	236pb	-	-	-	+
CG5	237pb	-	-	-	+
CG10	143pb	+	+	+	+
CG12	245pb	-	-	-	+
CG14	230pb	-	-	-	+
CG16	247pb	-	-	-	+
CG22	103pb	+	-	-	-
CG30	281pb	+	+	+	+
CG53	177pb	+	-	+	+
CG55	63pb	+	+	+	+
CG56	153pb	-	-	-	+
CG58	109pb	-	-	-	+
CG59	43pb	-	+	+	-
CG62	457pb	-	-	-	+
CG63	61pb	-	+	-	-
CG65	236pb	-	-	-	+
CG67	106pb	-	-	-	+

Tabela 3. Diversidade nucleotídica (π) para as sequências dos genes para histona H3, DNAr 5S e DNAsat G1 obtidas por microdissecção e amplificada por PCR, além de Illumina reads em *C. gomesi*. N = número de sequências, S = números de sítios polimórficos, Hap = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica.

Gene	Amostra	N	Tamanho	S	π	Hap	Hd
H3	0B PCR	16	370	9	0,00622	14	0,98
	B PCR	22	370	33	0,01246	18	0,98
5S	0B PCR	16	99	17	0,03407	11	0,94
	B PCR	7	97	14	0,04878	6	0,95
CG1	0B PCR	25	182-183	54	0,05241	16	0,92
	B PCR	47	182	20	0,01933	23	0,81
	0B reads	27	176-192	56	0,11451	17	0,96
	4B reads	35	180-194	56	0,10681	21	0,97

Tabela 4. Número de substituições sinónimas e não-sinónimas por sítios sinónimos (dS) e não sinónimos (dN), respectivamente, observadas nas sequências do gene para a histona H3, obtidas a partir do DNA genómico (B-PCR) e dos cromossomos B microdissecados (B-PCR) em *A. paranae*.

Amostra	dS	dN	dN/dS
0B-PCR	0,018	0,0019	0,105
B-PCR	0,0458	0,003	0,066

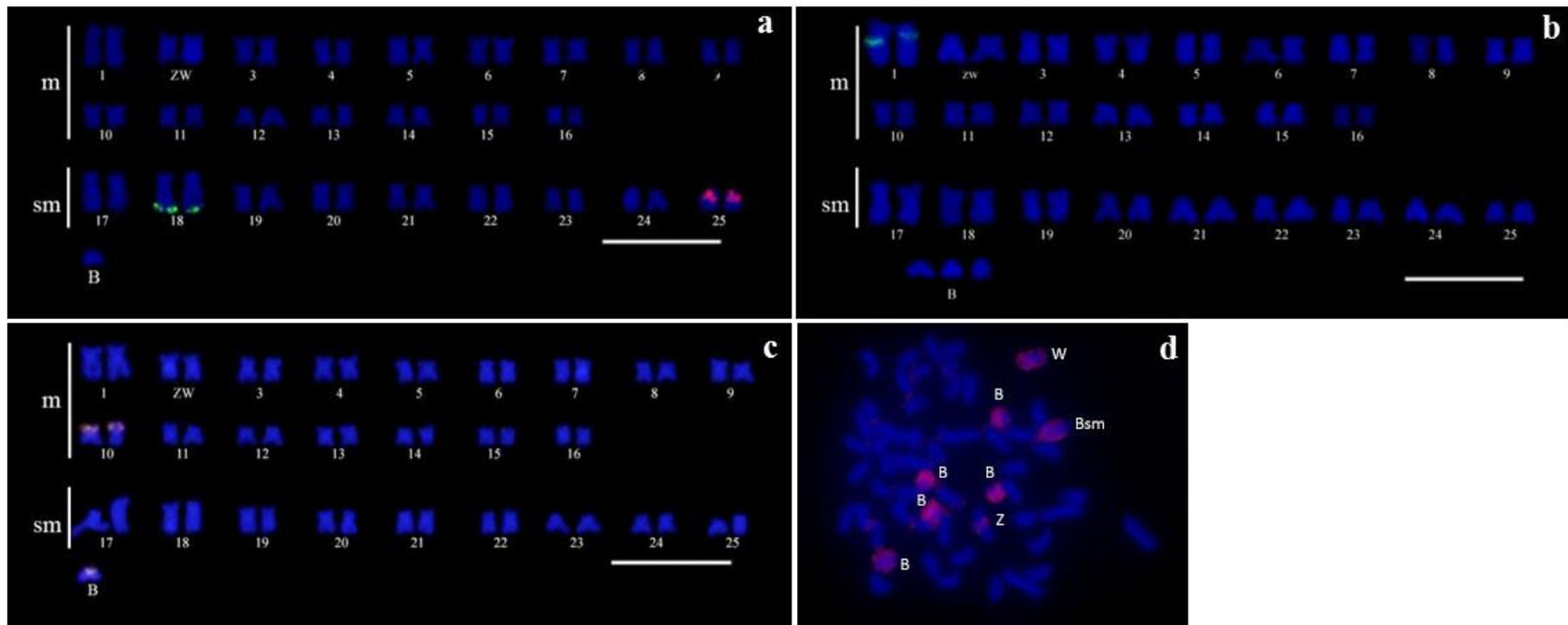


Figura 1. Cariótipos de *C. gomesi* construídos a partir de metáfases mitóticas submetidos à técnica de FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (a), snRNA U2 (b), histona H3 (c) e CgB (d). Notar o cromossomo B submetacêntrico (Bsm) totalmente marcado (d). A barra equivale a 10 µm.

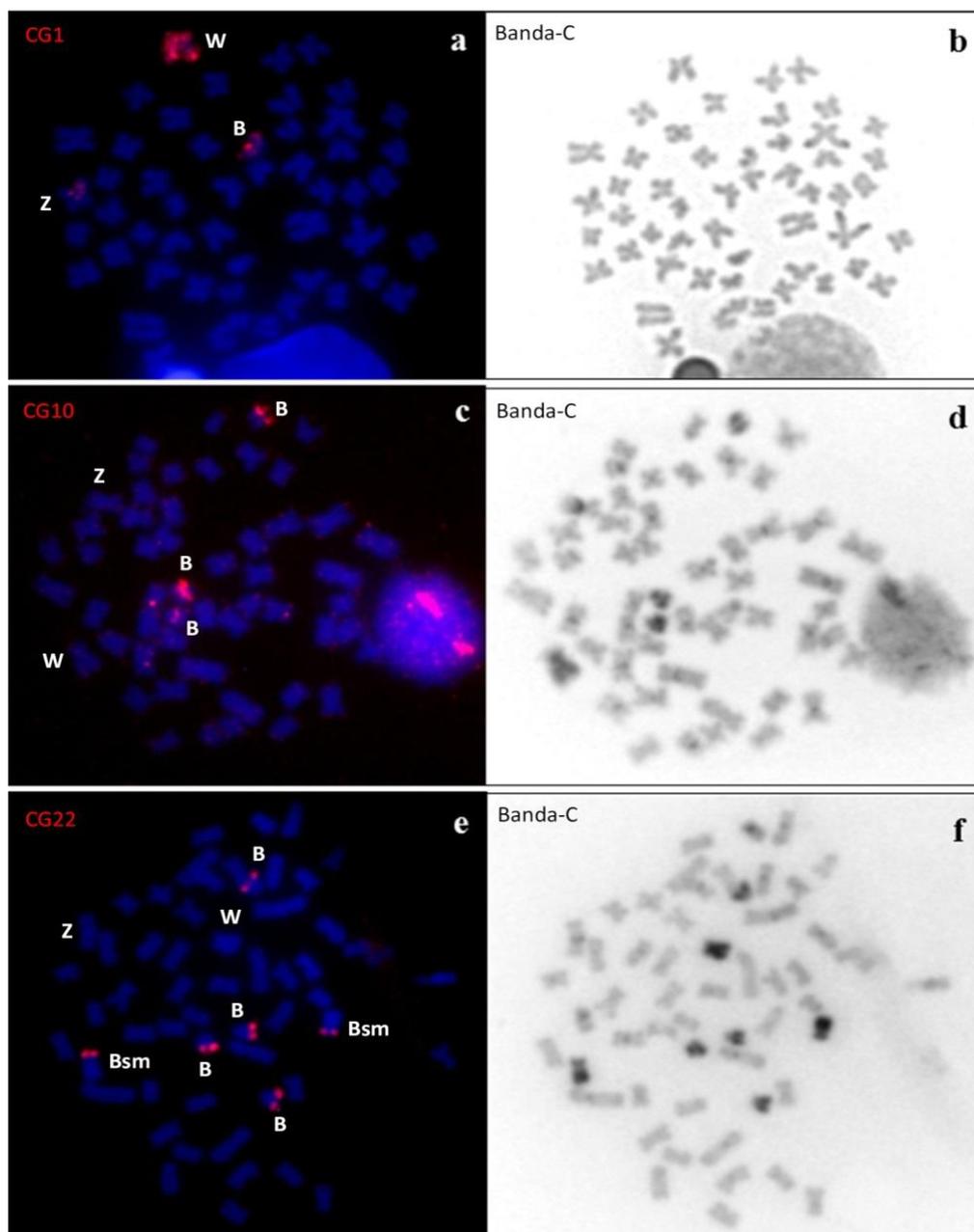


Figura 2. Cromossomos metafásicos de *C. gomesi* após FISH com diferentes sondas de DNAsat presentes nos cromossomos B (a, c, e) e Banda-C sequencial respectiva (b, d, f). Notar as marcações em ambas as variantes de cromossomos B em metáfases do indivíduo portador da variante Bsm (e, f).

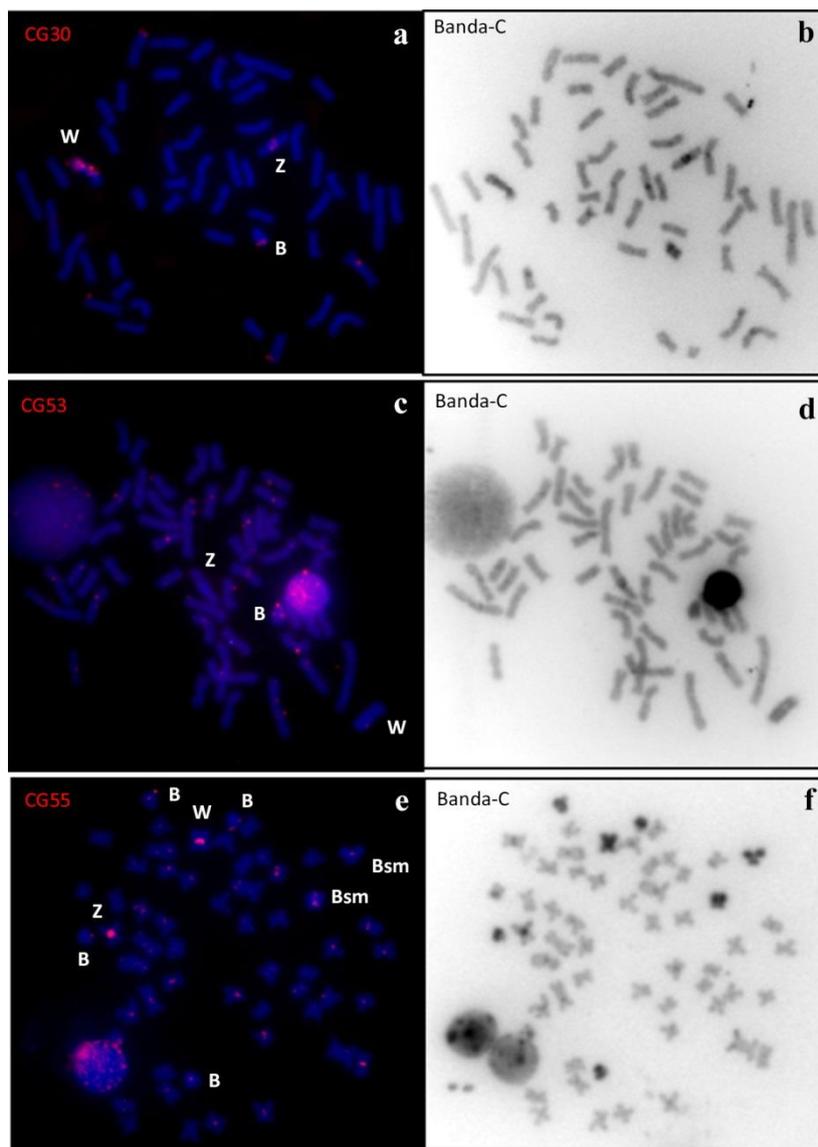


Figura 3. Cromossomos metafásicos de *C. gomesi* após FISH com diferentes sondas de DNAsats presentes nos cromossomos B, e Banda-C sequencial. . Notar as marcações em ambas as variantes de cromossomos B em metafases do indivíduo portador da variante Bsm.

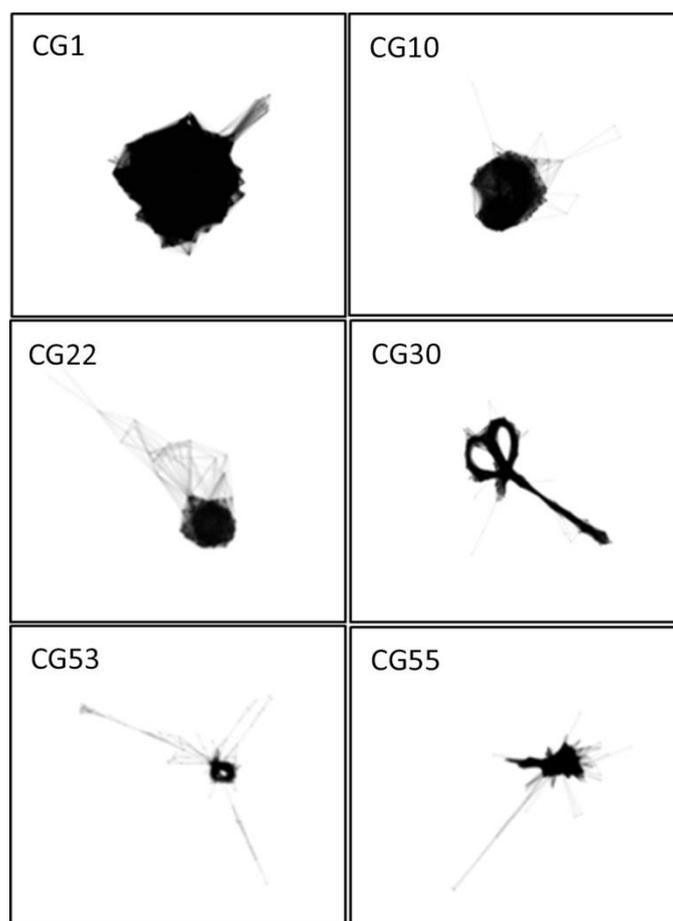


Figura 4. Gráficos representativos dos *clusters* obtidos das seqüências de DNAsat CG1, CG10, CG22, CG30, CG53 e CG55, após análise com RepeatExplorer.

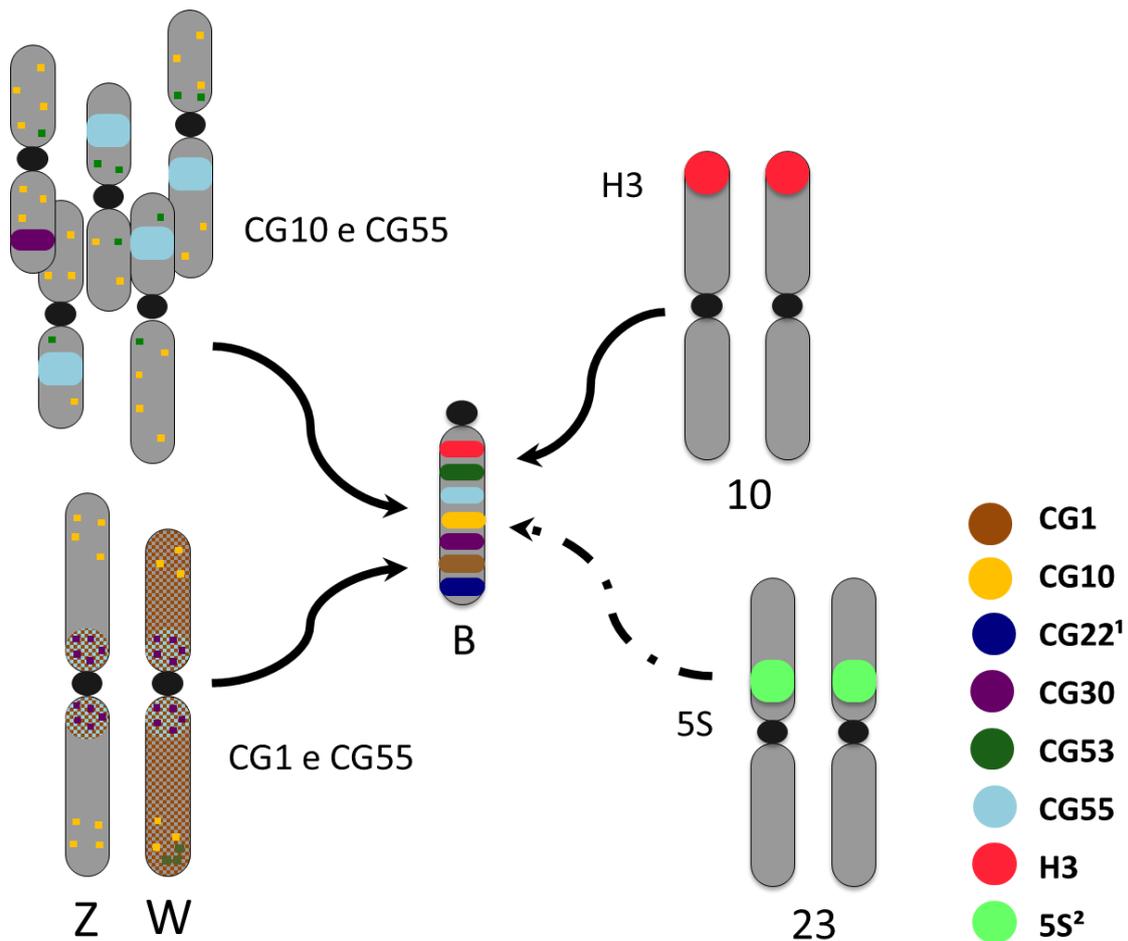


Figura 5. Ideograma demonstrando os marcadores citogenéticos de DNA repetitivo encontrados nos cromossomos B e suas respectivas localizações nos cromossomos do complemento A de *C. gomesi*. As posições das sequências de DNAsat nos cromossomos B são apenas ilustrativas. Notar o compartilhamento de 5 marcadores entre os cromossomos B e o par heteromórfico ZW.

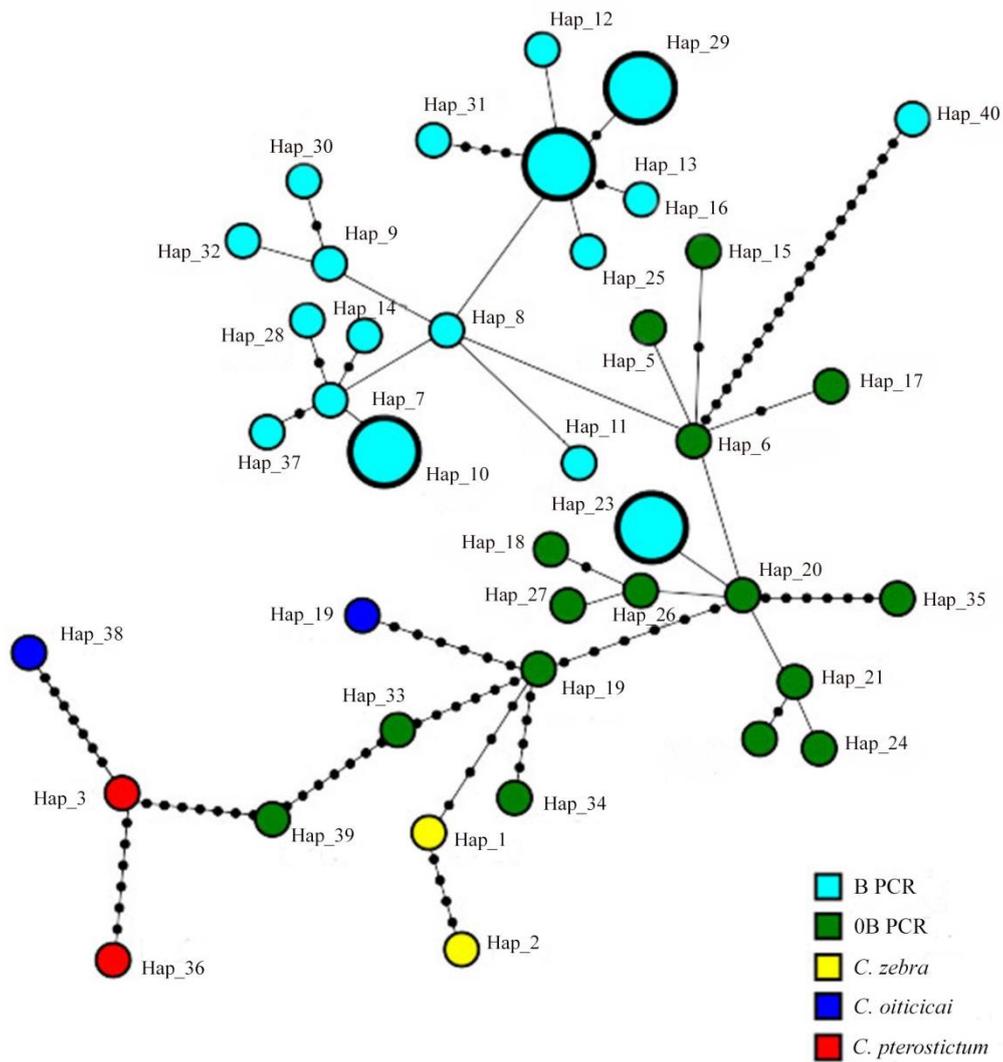


Figura 6. *Minimum-spanning tree* mostrando a relação entre os diferentes haplótipos do gene para a histona H3, obtidos a partir de diferentes bibliotecas. Os círculos coloridos representam haplótipos e cada ponto preto representa um evento de mutação. O diâmetro dos círculos é proporcional a abundância dos haplótipos.

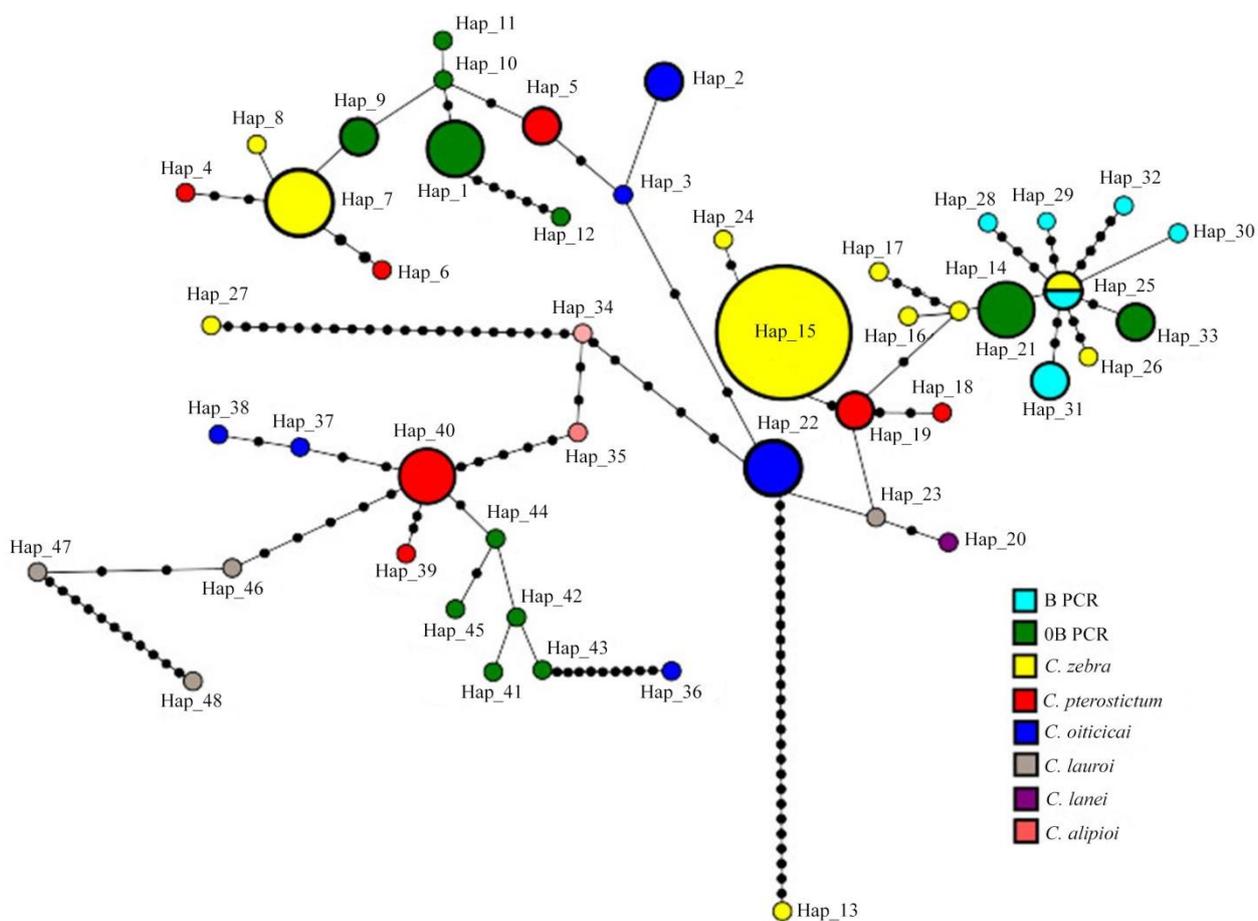


Figura 7. *Minimum-spanning tree* mostrando a relação entre os diferentes haplótipos do DNAr 5S obtidos de diferentes bibliotecas. Os círculos coloridos representam haplótipos, e cada ponto preto representa um evento de mutação. O diâmetro dos círculos é proporcional a abundância dos haplótipos

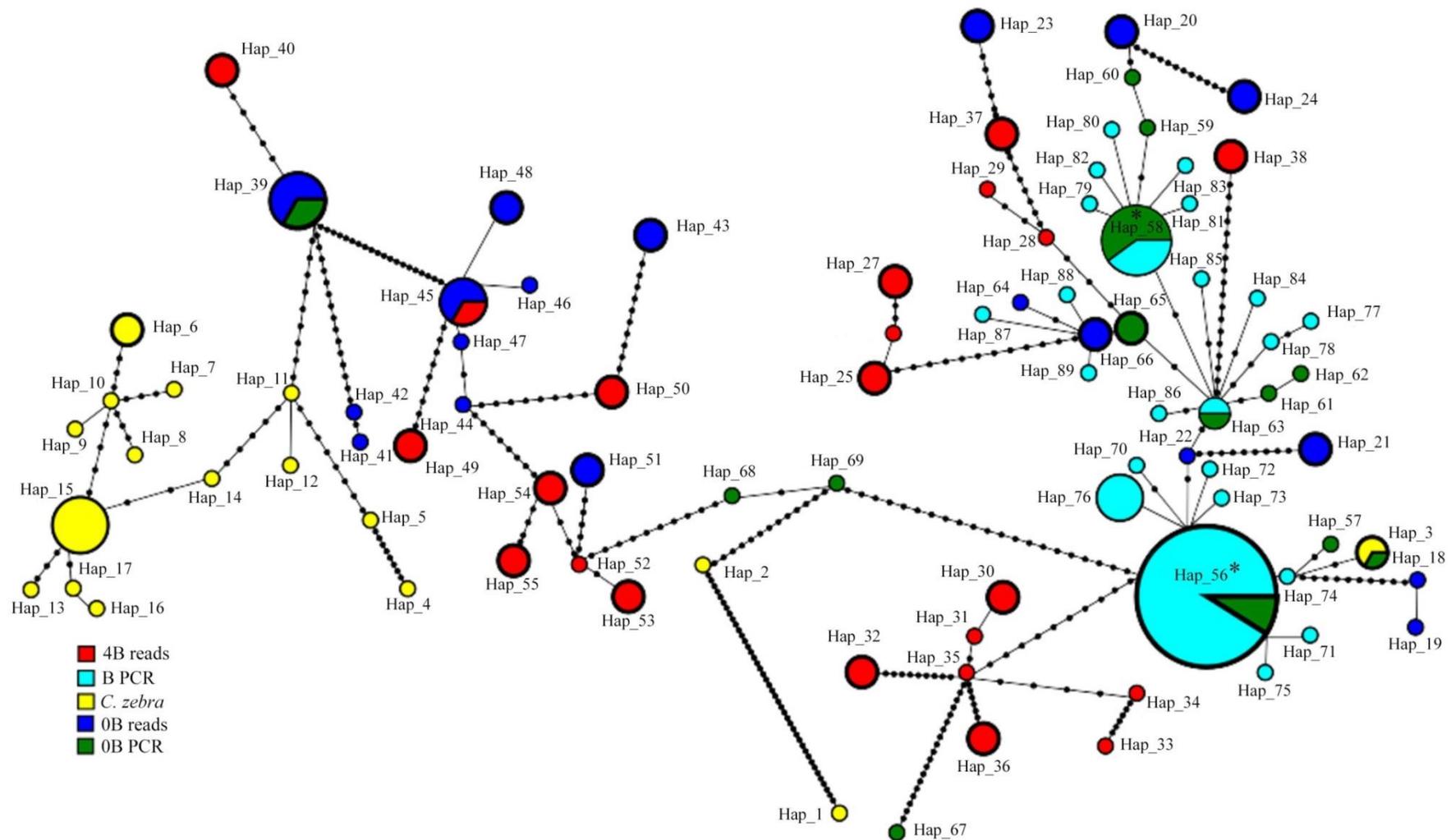


Figura 8. *Minimum-spanning tree* mostrando a relação entre os diferentes haplótipos do DNAsat CG1, obtidos a partir de de diferentes bibliotecas. Os ciclos coloridos representam os haplótipos e cada ponto preto representa um evento de mutação. O diâmetro dos círculos é proporcional à abundância dos haplótipos, enquanto os haplótipos com * apresentam diâmetros proporcionais à metade de sua abundância.

Tabela S1. Primers desenhados neste estudo para amplificar cada satDNA.

Família de DNAsat	Forward	Reverse
CG1	TTTAGGTTTGAAAAAGCGATG	GGACACAAGACAAGAACCTTT
CG2	ACAACAAAATCACTGCAGAAACA	ACACTCATTTGCCTCCAGAG
CG5	TGTGAATTGTTTTCTTTGCA	GACATTGAGTTTAAAGACTGGA
CG10	TGTTTTGGAGCAATACGATGC	ATTTCAATAGCTTTTAAACTAT
CG12	TGGGCAAAAGTATGACACTTGT	ACTCTCCAAAACACGTTTTAGG
CG14	TGATTCCCGACTTGATGCCTCT	TGTTTCAGCTGTATTTTGGCAGGA
CG16	TGCGCTAGAATGTCACCTTCAG	GCTTTTGGGCGCTTCTTGT
CG22	ACCCCTTAGGCCAAAAATACATGCC	CCAATTAAGTGCACATCACCTGGGC
CG30	TGTACTGCATTGTCTATGACT	CAGATGTCTCTACAAAAGCT
CG53	GCCATCAAATTACTCCAAAT	GGCAAAGTTCAGTAAAATGTCA
CG55	ACTGATGATGTGGTTATAGTGT	ACAGTCAAAGTTTGAGTACA
CG56	GGGTGCATGTGGCACTGGCT	GCGGTCGAGCCCCAGTTTGA
CG58	AGGGGTCTGGCTTAGCCCCG	GCCCAGTGTGGTGCCCTTCG
CG59	GGAAGCACATACTGACCACAGAGC	GTGCTTCCTGAGTCTGTGTTTGGGA
CG62	AGGGATCACTGTGAGGAGTGT	CGTTTGCAGCACTGAACAAGCGT
CG63	TCCCTCCTCCTCTAATCCACAGTCA	AGGACAGATAGAGGAGTGCAGGTCA
CG65	AGAGCGTTCTGAAGCGTTTA	TCCCTGCACTGTAGAGGCGT
CG67	ACCTCACCTCATCCGCCACA	AGGCCGAGGCCGAGGAGAAG

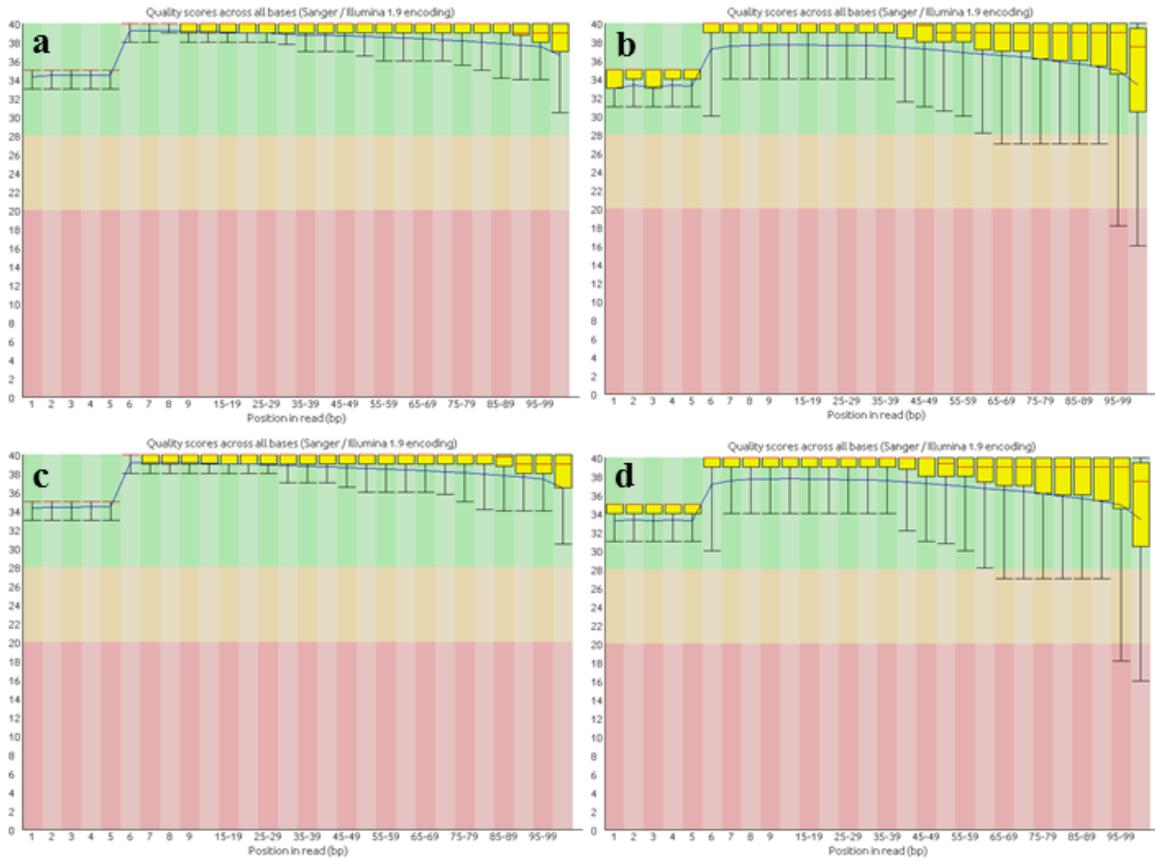


Figura S1. Gráfico de qualidade por base obtido pelo software fastQC em *C. gomesi*. Em *a* e *b* estão representados os reads paired-end gerados da biblioteca do indivíduo 0B. Em *c* e *d* estão representados os reads paired-end gerados da biblioteca do indivíduo 4B.

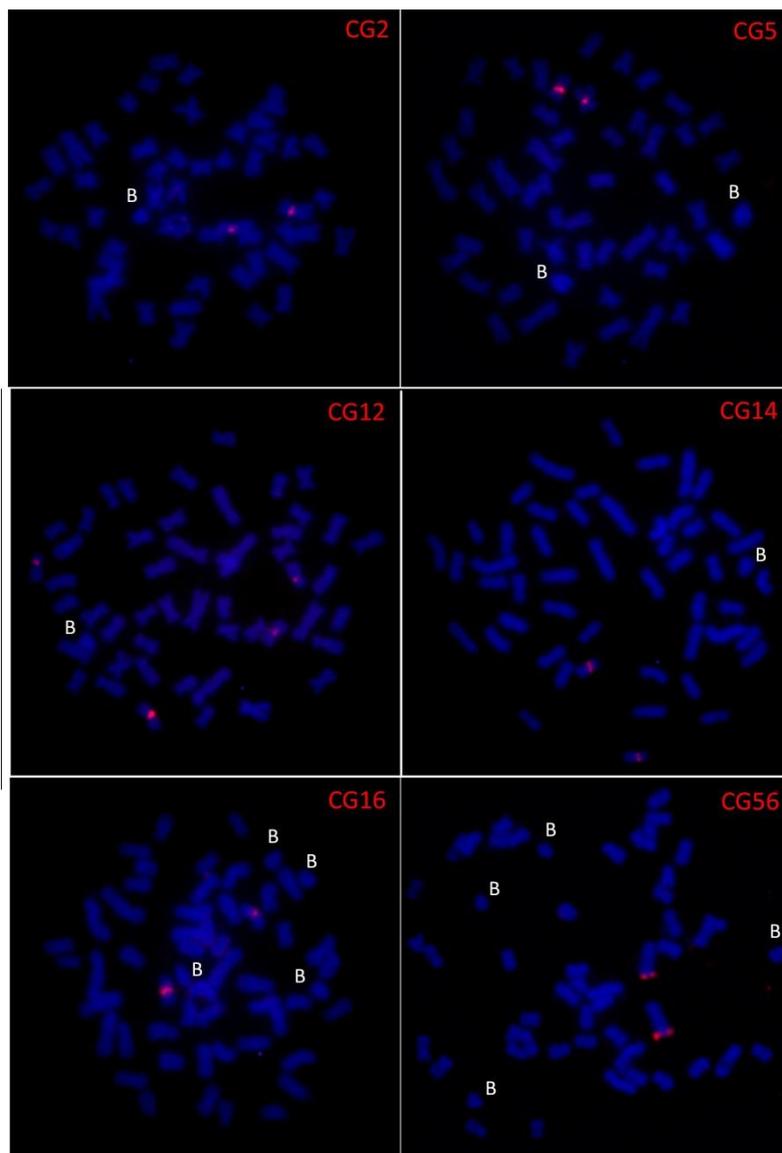


Figura S2. Cromossomos metafásicos de *C. gomesi* após aplicação da técnica de FISH com diferentes sondas de satDNA que não apresentaram marcações nos cromossomos B.

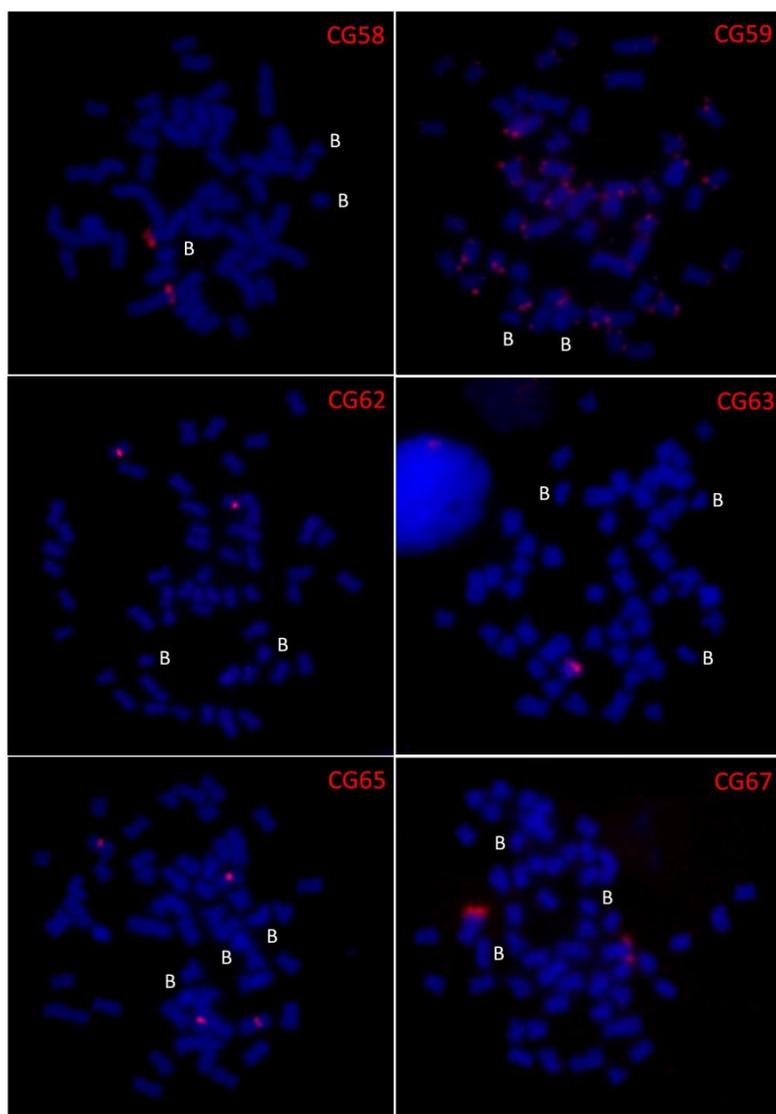


Figura S3. Cromossomos metafásicos de *C. gomesi* após aplicação da técnica de FISH com diferentes sondas de satDNA que não apresentaram marcações nos cromossomos B.

Capítulo 2

Origem dos cromossomos B em *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) e sua relação com cromossomos supranumerários de outras espécies do gênero *Characidium*

Resumo

Cromossomos B são componentes aparentemente dispensáveis encontrados no genomas de espécies de diferentes organismos, compostos basicamente de sequências repetitivas de DNA. Dentre uma variedade de questões a respeito destes elementos, a busca pelo conhecimento sobre sua origem e possíveis funções tem sido amplamente estudada. Em peixes, a ocorrência destes elementos genômicos foi relatada em cerca de 60 espécies, incluindo representantes do gênero *Characidium*, no qual estes cromossomos aparentam não ter uma origem única. Neste trabalho foram aplicadas técnicas de citogenética molecular com o objetivo de investigar a origem dos cromossomos B em uma população de *Characidium alipioi* e sua relação com cromossomos supranumerários de outras espécies do gênero. Os resultados mostraram que os cromossomos B em *C. alipioi* tiveram origem intraespecífica e aparentemente se originaram de forma independente em relação aos cromossomos B de *Characidium gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, espécies componentes do mesmo gênero, uma vez que não compartilham sequências específicas de DNA, bem como seus possíveis cromossomos ancestrais, além de pertencerem a diferentes clados filogenéticos. O compartilhamento de sequências encontradas nos cromossomos supranumerários e num par de cromossomos submetacêntricos do complemento A nesta espécie constitui forte indicativo da sua origem a partir destes cromossomos.

Introdução

Cromossomos B ou supranumerários são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão (A) e aparentemente dispensáveis aos organismos portadores, sendo encontrados em cerca de 15% das espécies de organismos eucariontes (Camacho 2005). Questões a respeito da origem dos cromossomos supranumerários surgiram praticamente com a sua primeira visualização nos organismos e ainda permanecem

pouco claras para a maioria dos sistemas de cromossomos B já identificados. Usualmente, considera-se que os cromossomos B são derivados dos cromossomos do complemento A a partir de elementos genômicos da própria espécie (origem intraespecífica) ou de espécies próximas (origem interespecífica) (Banaei-Moghaddam et al. 2015). A origem intraespecífica dos cromossomos B foi demonstrada em milho (Lamb et al. 2005; Peng et al. 2011), em gafanhotos (Teruel et al. 2010), em centeio (Martis et al. 2012) e em peixes (Mestriner et al. 2000; Silva et al. 2013; Utsunomia et al. 2016; Valente et al. 2014). Por outro lado, também há casos em que os cromossomos B podem ter surgido espontaneamente em resposta a novas condições do genoma, em decorrência de hibridação interespecífica, como em plantas do gênero *Coix* (Sapre & Deshepande 1987), no peixe *Poecilia formosa* (Schartl et al. 1995) e na vespa *Nasonia vitripennis* (McAllister & Werren 1997).

Uma característica evolutiva significativa dos cromossomos B é a presença acumulada de sequências de DNA repetitivo (Banaei-Moghaddam et al. 2015; Camacho 2005; Houben et al. 2014). Este tipo de componente genômico tem sido bastante informativo para o entendimento dos processos envolvidos na origem e evolução dos cromossomos B, especialmente quando utilizado em abordagens integradas de áreas complementares como citogenética e genômica. Resultados obtidos pela aplicação de técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e análises de sequências do DNA têm sido de grande aplicação e efetividade na demonstração da origem intraespecífica dos cromossomos B em peixes (Silva et al. 2013, 2016; Utsunomia et al. 2016), além da identificação da presença de genes intactos com expressão confirmada nestes elementos genômicos como já observado em centeio (Banei-Moghaddam et al. 2015) e também em peixes (Valente et al. 2014).

Dentre as espécies de peixes portadoras de cromossomos B, aquelas pertencentes ao gênero *Characidium* apresentam características citogenéticas interessantes, uma vez que os cromossomos B provavelmente tiveram sua origem de forma independente em diferentes espécies deste grupo, enquanto os cromossomos heteromórficos ligados ao sexo do tipo ZW aparentam ser decorrentes de um processo de origem único e comum no gênero. Nesse sentido, os cromossomos B de *C. oiticicai* teriam se originado de modo interespecífico, enquanto que em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, estes elementos parecem ter tido uma origem intraespecífica, a partir dos cromossomos heteromórficos considerados sexuais (Pansonato-Alves et al. 2014).

A homologia molecular dos cromossomos B em *C. gomesi* foi recentemente confirmada por seu comportamento bivalente durante a prófase meiótica em indivíduos portadores de dois cromossomos B (Serrano et al. 2016). Os resultados obtidos até o momento abrem novas perspectivas de estudos dos cromossomos B no gênero *Characidium* e caracterizam este grupo de organismos como um modelo potencialmente interessante para estudos envolvendo a origem e evolução destes elementos genômicos. Neste sentido, o presente estudo envolveu a utilização de técnicas de citogenética clássica de bandamento-C, microdissecção, pintura cromossômica e hibridação *in situ* fluorescente em *Characidium alipioi*, espécie na qual a presença destes elementos não era até então conhecida, com o objetivo de obter informações a respeito da origem e evolução dos cromossomos B neste organismo e em outros componentes do gênero *Characidium*.

Materiais e Métodos

Origem das amostras, análises cariotípicas e extração de DNA

Foram analisados 19 exemplares de *C. alipioi* (9 fêmeas e 10 machos) provenientes do Rio Ribeirão Grande, bacia do Rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba-SP (22°49' 00.3" S 45° 25' 23.7") (Tabela 1). Os animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras, conforme permissão para coleta número 3245 emitida pelo MMA/IBAMA/SISBIO. Os procedimentos de coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com o regulamento internacional de experimentos com animais seguido pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP número de protocolo 304). Os exemplares analisados foram identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, São Paulo, Brasil, sob o número 22287.

Para realização das preparações citogenéticas, os animais foram anestesiados, dissecados e as preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas seguindo o protocolo utilizado por Foresti et al. (1981) e o bandamento C foi efetuado de acordo com o protocolo descrito por Sumner (1972). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critérios estabelecidos por Levan et al (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subteloicêntricos (st) e organizados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Para a aplicação das técnicas moleculares procedeu-se à extração e purificação do DNA dos exemplares da espécie com a utilização do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Análise do DNA mitocondrial

A amplificação e sequenciamento parcial dos genes Cytochrome oxidase C subunit1 (COI) e Cytochrome B gene (Cyt B) foi realizada para identificação dos exemplares. Os *primers* utilizados foram Cyt B L 14841 (5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA -3') e Cyt B H 15915b (5'- AAC CTC CGA TCT TCG GAT TACAAG AC -3') (Kocher et al. 1989) para o Cyt B e COI L6252-Asn (5'- AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G -3') e H7271-COXI (5'- TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTC TTT T -3') para o COI (Melo et al. 2011). As sequências foram inicialmente analisadas pelo programa Geneious Pro v8.05 e o alinhamento foi feito com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004). As distâncias médias entre as sequências foram calculadas utilizando-se o “pairwise deletion” pelo software MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

Microdissecção cromossômica e obtenção de sondas

A microdissecção cromossômica foi realizada em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100. Para efetuar a pintura cromossômica, foram microdissecados dez cromossomos B de cada espécie a partir de preparações citogenéticas de exemplares de *C. alipioi*, *C. gomesi* e *C. oiticicai* portadores de apenas um cromossomo extra, sendo as sondas nomeadas como CaB para *C. alipioi*, CgB para *C. gomesi* e CoB para *C. oiticicai*.

Para a confecção das sondas, o DNA microdissecado de cada espécie foi colocado em um tubo contendo 9µl de água DNase-free ultrapura e amplificado usando o Kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (wga4-Sigma) (Gribble et al. 2004). Após a amplificação inicial, foram geradas as sondas de DNA CaB, CgB e CoB, que foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) utilizando o Kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification (wga3-Sigma), seguindo o protocolo do fabricante.

Sondas de DNA repetitivo

Sondas para os genes DNAr 18S e 5S, snDNA U2 e para a histona H3 foram obtidas por PCR a partir do genoma de *C. alipioi* utilizando *primers* já descritos anteriormente (Colgan et al. 1998; Pendás et al. 1995; Pineau et al. 2005; Silva et al.

2015; Utsunomia et al. 2016). As sondas de DNAr 18S, snDNA U2 e histona H3 foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP (Roche), enquanto a sonda DNAr 5S foi marcada com biotin-16-dUTP (Roche). Sondas de oligonucleotídeos contendo sequências dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (GAG)₁₀ foram marcadas diretamente com TAMRA durante o processo de síntese realizado pela Sigma, como descrito por Kubat et al. (2008).

Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

Para os experimentos de FISH, os cromossomos foram tratados de acordo com os procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986), sob altas condições de estringência. As imagens foram capturadas digitalmente usando o software Image Pro plus 6.0 (Media Cybernetics), utilizando filtros adequados do microscópio de epifluorescência (Olympus BX61) equipado com uma câmera Olympus DP70. A composição final das imagens foi realizada com a aplicação do software editor de imagens Adobe Photoshop CS6, utilizando escalas de imagem e tamanho uniformes.

Resultados

Análises cromossômicas

Os exemplares de *C. alipioi* analisados apresentaram número diploide de 50 cromossomos (32m+18sm), com sistema de cromossomos heteromórficos relacionados ao sexo do tipo ZW similar ao encontrado em outras espécies do gênero já analisadas (Figura 2). Adicionalmente, células com até 4 cromossomos B mitoticamente instáveis foram observadas em 45% dos indivíduos (Tabela 1). O bandamento-C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva localizados na região pericentromérica de todos os cromossomos, além de um conspicuo bloco distal no braço maior do cromossomo Z, sendo os cromossomos W e B totalmente heterocromáticos (Figura 2b).

Pintura cromossômica

A técnica de pintura cromossômica realizada nas preparações cromossômicas de *C. alipioi* utilizando-se a sonda CaB apresentou marcações sobre toda a extensão do cromossomo B e na região pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos do complemento A desta espécie (Figura 3a). Em contrapartida, esta mesma sonda não apresentou marcações evidentes nos genomas de *C. gomesi* e *C. oiticica* (Figuras 3b e c). O mesmo pode ser observado pela hibridação da sonda CoB

em preparações de *C. alipioi* (Figura 3d). Por outro lado, a sonda CgB apresentou sinais de hibridação sobre o cromossomo W de *C. alipioi* (Figura 3e).

Distribuição de sondas de DNA repetitivo

Experimentos de FISH em preparações cromossômicas de *C. alipioi* utilizando sonda para o DNAr 18S revelaram sítios deste gene em posição terminal do par autossômico 18, enquanto o DNAr 5S foi mapeado na região pericentromérica do par cromossômico 20 (Figura 4a). Sítios do gene para a histona H3 foram localizados nos cromossomos do par metacêntrico 10 (Figura 4b), enquanto a sonda para o gene snRNA U2 revelou marcações nos cromossomos submetacêntricos do par 17 (Figura 4c).

As hibridações com as sondas de sequências microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ revelaram padrões semelhantes de distribuição em preparações cromossômicas de *C. alipioi*, com acúmulo preferencial de sequências nas regiões terminais dos cromossomos, exceto para os cromossomos W e B (Figuras 5a e b), os quais aparentemente apresentaram menor abundância de pontos, com sinais fracos de hibridação. Por outro lado, o microssatélite (GAG)₁₀ se mostrou intensamente acumulado nos cromossomos W e B desta espécie (Figura 5c).

Análise do DNA mitocondrial

A análise de distância média entre as sequências de COI e CytB obtidas no presente trabalho e das demais espécies retiradas do Genbank demonstrou alta similaridade entre as sequências de *C. alipioi* da população de Santa Bárbara do Tugúrio-MG (Pansonato-Alves et al. 2014) e os exemplares aqui analisados (Tabelas S1 e S2), confirmando assim o posicionamento filogenético desta população (Figura 1).

Discussão

A presença de cromossomos B ou supranumerários em *Characidium alipioi* é apresentada pela primeira vez no presente estudo, uma vez que a população de *C. alipioi* de Santa Bárbara do Tugúrio-MG analisada por Pansonato-Alves et al. (2014) não apresentou cromossomos extras. A presença destes elementos restrita a determinadas populações foi observada em outras espécies do gênero *Characidium*, como *C. zebra*, *C. pterostictum* e *C. gomesi* (Pansonato-Alves et al. 2014). Embora os dados aqui apresentados não permitam realizar inferências sobre a dinâmica e o relacionamento destes cromossomos entre as populações, ao menos dois mecanismos têm sido

propostos de estarem envolvidos na ausência de cromossomos B em determinadas populações, podendo ser citadas as barreiras geográficas que limitariam a propagação de indivíduos portadores destes elementos, bem como a estrita relação entre os fatores temperatura e pluviosidade que poderiam estar atuando na variação da presença de cromossomos B, seguindo dois modelos que atuam em *Myrmeleotettix maculatus* e *Eyprepocnemis plorans*, respectivamente (Cabrero et al. 1997; Hewitt and John 1967; Hewitt and Ruscoe 1971; Manrique-Poyato et al. 2015).

Indivíduos da mesma espécie e localidade estudados neste trabalho já foram analisados em estudo anterior realizado por Centofante et al. (2003), sem que estes autores tivessem detectado cromossomos B nos diversos indivíduos amostrados naquela ocasião. Embora estudos citogenéticos no gênero *Characidium* tenham revelado a ocorrência de cromossomos supranumerários restritos a determinadas populações de algumas espécies (Pansonato-Alves et al. 2014), deve-se destacar que a proximidade geográfica entre os pontos amostrados e o tempo entre as análises do presente estudo e daqueles realizados por Centofante et al. (2003) e por Pansonato-Alves et al. (2014), não parecem caracterizar as duas amostras como pertencentes a diferentes populações. Do mesmo modo, não pode ser afirmado que os cromossomos B tenham surgido nesta população após a amostragem do primeiro trabalho. Assim, é provável que as amostras analisadas nos anos de 2003 fossem coincidentemente formadas por indivíduos não portadores destes elementos extras, uma vez que indivíduos portadores e não portadores foram identificados na amostra analisada aqui.

Os dados obtidos com a aplicação da técnica de pintura cromossômica utilizando sondas de DNA proveniente dos cromossomos B de *C. alipioi* (CaB) indicam o compartilhamento de sequências entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento A, mais especificamente com a região pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos. Este resultado provavelmente reflete a existência de relação entre estes cromossomos e apontam para uma origem intraespecífica dos cromossomos supranumerários nesta espécie, sendo o par cromossômico submetacêntrico do complemento A o possível cromossomo ancestral. A identificação de procedência dos cromossomos B a partir de componentes do complemento A da espécie hospedeira tem sido apresentada com frequência (Bugrov et al. 2003; Jesus et al. 2003; Lamb et al. 2005; Peng et al. 2011; Silva et al. 2014; Teruel et al. 2010; Utsunomia et al. 2016; Valente et al. 2014), embora em apenas alguns casos tenha sido possível identificar o cromossomo ancestral, como em gafanhotos (Bueno et al. 2013).

Teruel et al. 2010) e nos peixes *Astyanax paranae* (Silva et al. 2014) e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Utsunomia et al. 2016).

A origem intraespecífica de cromossomos B já foi relatada em outras espécies do gênero *Characidium*, nomeadamente *C. pterostictum*, *C. gomesi* e *Characidium* sp. aff. *C. vidalli* (Pansonato-Alves et al. 2014; Schacchetti et al. 2015). No entanto, estes elementos supranumerários não parecem compartilhar os mesmos cromossomos ancestrais do supranumerário presente em *C. alipioi*, uma vez que nestas espécies a origem se deu a partir dos cromossomos Z e W, enquanto no presente estudo a sonda CaB não apresentou marcação nestes cromossomos. Além disso, os cromossomos B de *C. alipioi* também não demonstraram homologia com os supranumerários de *C. gomesi* e *C. oiticicai* em resultados obtidos por pintura cromossômica cruzada com as sondas CaB, CgB e CoB, espécies estas cujos cromossomos B são aparentemente compostos por diferentes tipos de DNA repetitivo e apresentam diferentes origens (Pansonato-Alves et al. 2014). Assim, pode ser considerado que os elementos supranumerários em *C. alipioi* tiveram sua origem de forma independente em relação aos outros tipos de cromossomos B já relatados nos representantes deste gênero, sendo que a posição filogenética destas espécies alocadas em diferentes clados (Figura 1) apoiaria esta suposição. Contudo, estas conclusões devem ser tomadas com precaução, dado que as sondas obtidas por microdissecção são compostas de sequências anônimas, além do que o método de amplificação utilizado (GenomePlex) pode privilegiar sequências específicas de DNA repetitivo presentes nos cromossomos B e ausentes em outros cromossomos do complemento A. Neste contexto, não pode ser descartado o fato de que outras sequências compartilhadas entre os cromossomos A e B poderiam não estar representadas nas sondas utilizadas, conforme já observado por Pansonato-Alves et al. (2014).

As hibridações com sequências de DNA microssatélite demonstraram a presença destes elementos repetitivos nos cromossomos B, sendo que (GA)₁₅ e (CA)₁₅ se apresentaram dispersos, com blocos conspícuos nas regiões terminais dos cromossomos do complemento A e de modo menos abundante e pouco expressivo nos cromossomos supranumerários. Por outro lado, um evidente processo de acúmulo foi evidenciado com relação à sequência (GAG)₁₀, uma vez que os resultados das hibridações com a sonda desta sequência revelaram a presença preferencial de blocos conspícuos nos cromossomos W e B de *C. alipioi*. De modo semelhante, microssatélites foram

detectados em cromossomos B de milho (Ananiev et al. 2005), centeio (Langdon et al. 2000) e em gafanhotos (Milani & Cabral-de-Mello 2014; Ruíz-Ruano et al. 2015).

Considerando que a sonda CaB não demonstrou compartilhamento de sequências destes elementos com os cromossomos sexuais na espécie *C. alipioi*, uma possível explicação seria a de que a sonda não conteria este microssatélite e isto poderia ter ocorrido provavelmente em decorrência do método de amplificação utilizado, como já mencionado acima. No entanto, se for considerado que os mecanismos de acumulação deste tipo de DNA repetitivo, que permitem sua fixação em determinados cromossomos devido a sua natureza não recombinante e sua preferencial acumulação em regiões heterocromáticas, conforme verificado em outros estudos (Cuadrado & Jouve 2011; Lohe et al. 1993; Scacchetti et al. 2015), a distribuição deste microssatélite nestes cromossomos poderia não refletir aspectos sobre sua origem, mas sim ser uma decorrência do seu mecanismo de acumulação após o surgimento dos cromossomos B.

Os resultados obtidos permitiram ampliar o conhecimento sobre a estrutura e composição dos cromossomos B entre os representantes do gênero *Characidium*, em particular em *C. alipioi*, que se mostraram enriquecidos em sequências microssatélite. Além disso, foi caracterizado o compartilhamento de sequências entre componentes do complemento A e dos cromossomos B desta espécie, apontando para uma origem intraespecífica destes cromossomos que, no entanto, parece ter ocorrido de forma independente em relação àquele ocorrido em outras espécies do gênero. Tais observações reforçam a proposição deste grupo de peixes como um modelo interessante de estudos sobre a origem e estrutura destes elementos genômicos, bem como dos mecanismos envolvidos na sua origem e das estratégias evolutivas apresentadas pelos cromossomos supranumerários nos peixes.

Referências

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

Tabela 1. Polimorfismo numérico de cromossomos B em células de *Characidium alipioi*. Amostras: Número de machos (M) e fêmeas (F) analisadas. Prevalência: Porcentagem de exemplares, total e por sexo, portando cromossomos B.

Amostra	Número de cromossomos nas amostras					Prevalência
	50	51	52	53	54	
9 F	5	2	0	1	1	44%
10 M	5	3	1	0	1	50%
Total 19	10	5	1	1	2	47%

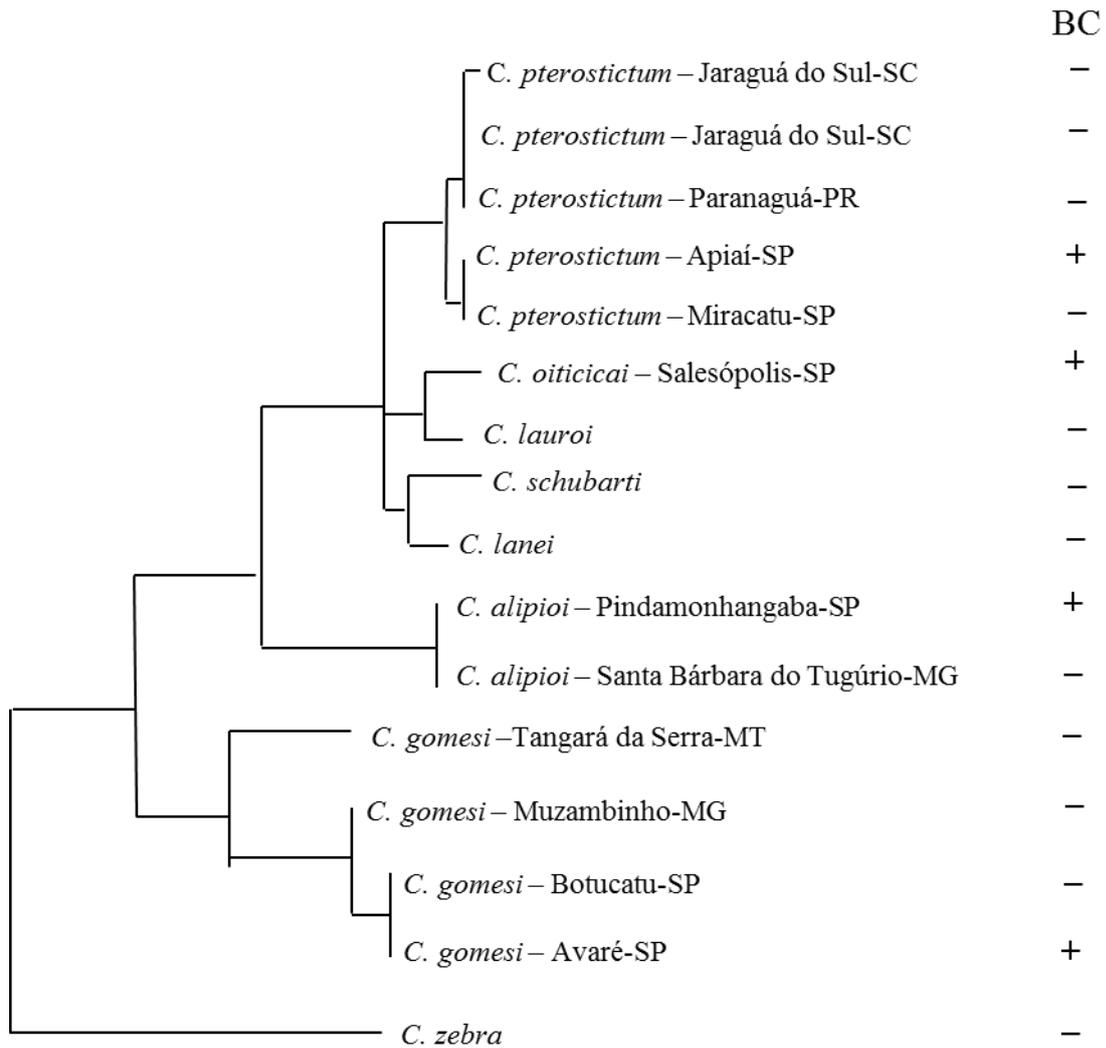


Figura 1. Filogenia do gênero *Characidium* adaptada de Pansonato-Alves et al. (2014), com posicionamento da população analisada no presente trabalho. BC: presença ou ausência de cromossomos B.

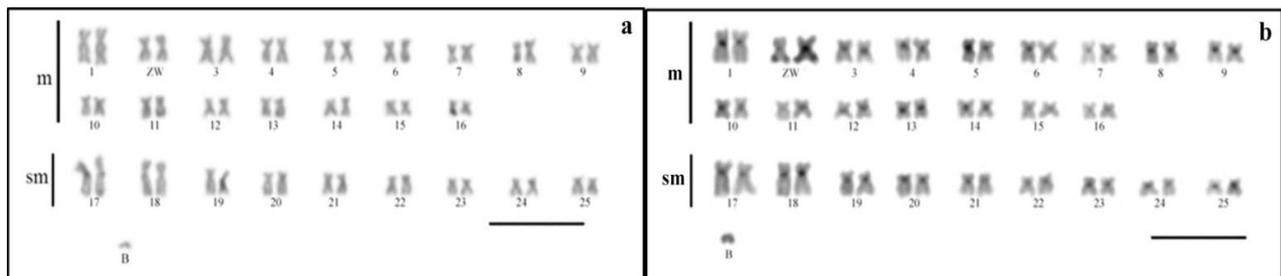


Figura 2. Cariótipos de *Characidium alipioi* construídos a partir de metáfases mitóticas submetidas à coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento-C (b). Notar o comportamento heterocromático do cromossomo supranumerário (b). A barra equivale a 10 μ m.

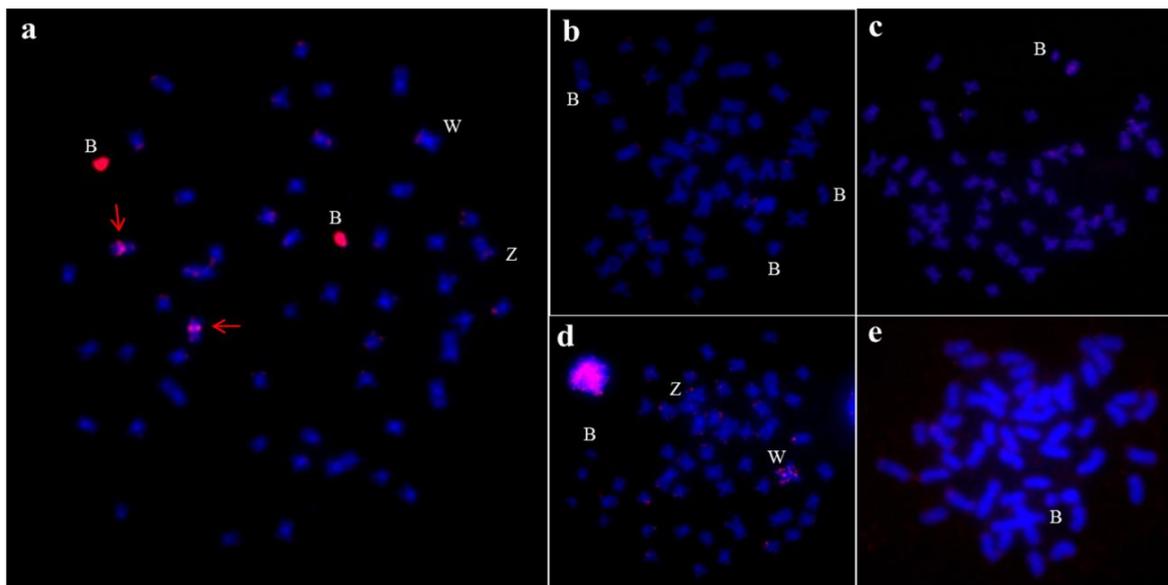


Figura 3. Pintura cromossômica cruzada utilizando a sonda CaB em *Characidium alipioi* (a), *C. gomesi* (b) e *C. oiticicae* (c) e com as sondas CgB (d) e CoB (e) em *C. alipioi*.

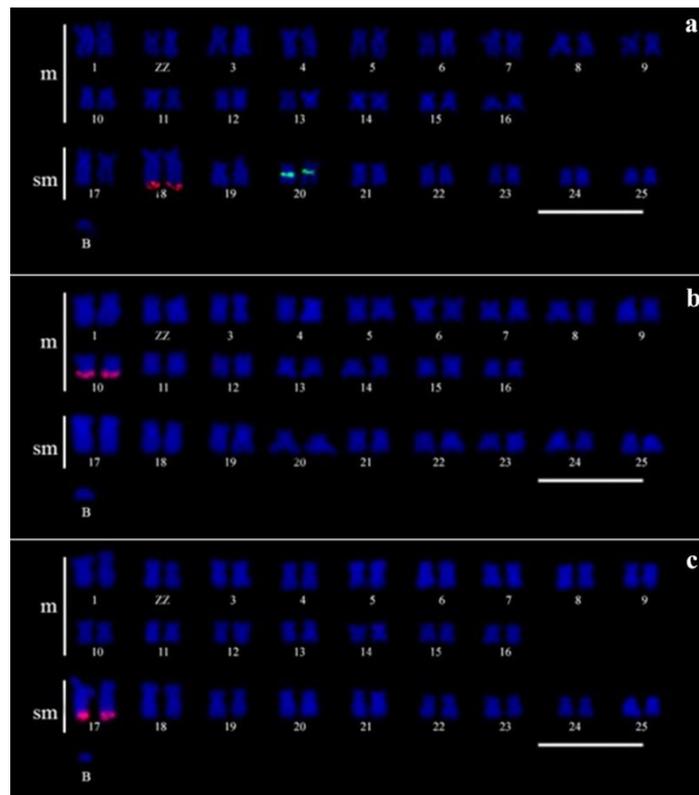


Figura 4. Cariótipos de *Characidium alipioi* construídos a partir de metáfases mitóticas submetidos à técnica de FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (erde) (a), histona H3 (b) e snRNA U2 (c). A barra equivale a 10 um.

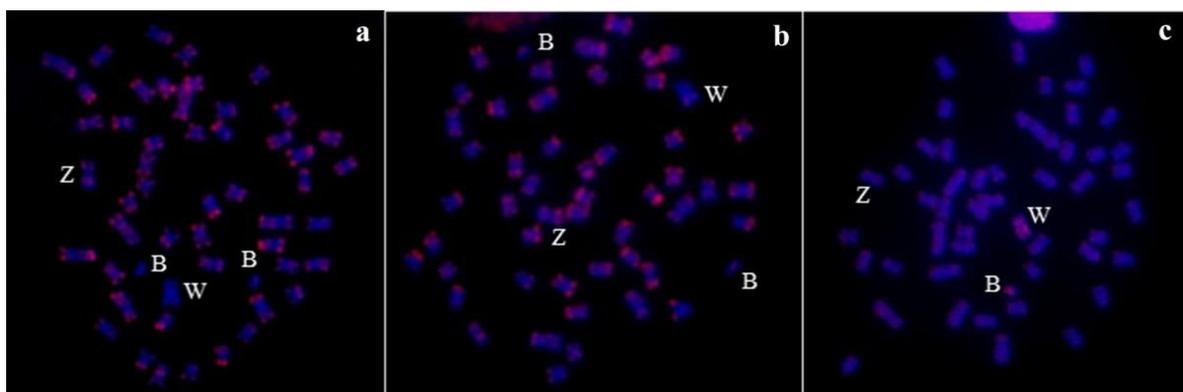


Figura 5. Metáfases mitóticas submetidas a FISH com os microssatélites $(GA)_{15}$ em **a**, $(CA)_{15}$ em **b**, e $(GAG)_{10}$ em **c**. Notar o acúmulo de marcação da sequência $(GAG)_{10}$ nos cromossomos B e W.

Tabela S1: Distância média entre as sequências de CytB de espécies de *Characidium* obtidas no presente trabalho e retiradas do Genbank.

Distância media entre as sequências de CytB								
<i>C.alipioi</i> - Paraiba do Sul								
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0.001							
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0.001	0						
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0.001	0	0					
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0.001	0	0	0				
<i>C. oiticicai</i>	0.140	0.141	0.141	0.141	0.141			
<i>C. pterostictum</i>	0.141	0.142	0.142	0.142	0.142	0.076		
<i>C. gomesi</i>	0.157	0.159	0.159	0.159	0.159	0.154	0.162	
<i>C. zebra</i>	0.190	0.191	0.191	0.191	0.191	0.177	0.199	0.188

Tabela S2: Distância média entre as sequências de COI de espécies de *Characidium* obtidas no presente trabalho e retiradas do Genbank.

Distância media entre as sequências de COI								
<i>C.alipioi</i> - Paraiba do Sul								
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0							
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0	0						
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0	0	0					
<i>C.alipioi</i> - Pindamonhangaba	0	0	0	0				
<i>C. pterostictum</i>	0.102	0.102	0.103	0.102	0.103			
<i>C. oiticicai</i>	0.119	0.119	0.120	0.119	0.120	0.049		
<i>C. gomesi</i>	0.173	0.173	0.174	0.173	0.174	0.141	0.158	
<i>C. zebra</i>	0.199	0.199	0.199	0.199	0.199	0.191	0.185	0.198

5. Considerações Finais

O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu) e visou aumentar o conhecimento sobre a estrutura física e molecular de cromossomos supranumerários em peixes Neotropicais, bem como sobre a origem e os aspectos evolutivos deste sistema em espécies do gênero *Characidium*.

As diferentes metodologias utilizadas neste trabalho permitiram ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos de origem e conteúdo molecular dos cromossomos supranumerários, demonstrando a eficácia da união de técnicas de citogenética clássica, molecular e de sequenciamento massivo neste tipo de estudos. Em *C. gomesi*, espécie na qual os cromossomos B já haviam sido estudados anteriormente, a utilização de dados massivos na busca de sequências satélites, combinados com técnicas de citogenética molecular, permitiram o aprofundamento do conhecimento do material genômico destes cromossomos, bem como a determinação de sua origem com mais precisão a partir dos cromossomos sexuais. Além disso, a variante de cromossomo B submetacêntrico, observada em representante do gênero pela primeira vez, aparenta ter a mesma origem da variante acrocêntrica, uma vez que estes elementos compartilham sequências. Por outro lado, em *C. alipioi*, em que os cromossomos B ainda não haviam sido explorados, a utilização de técnicas de citogenética molecular e análise de segmentos COI apontam que a origem deste cromossomo se deu de forma intraespecífica, ocorrendo em processo independente, não compartilhando os cromossomos ancestrais de outras espécies do gênero, uma vez que a pintura cromossômica aponta sua origem a partir do cromossomo 19, bem como não demonstram compartilhamento de sequências com supranumerários de outras duas espécies de *Characidium*.

A busca por sequências repetitivas nestes elementos extras permitiu também evidenciar seu enriquecimento em microssatélites na espécie *C. alipioi*, bem como a presença do gene para a histona H3 e diversos DNAs satélites no supranumerário de *C. gomesi*, sendo que alguns apresentam amplificação massiva neste elemento. Este tipo de informação segue os modelos propostos de acumulação de sequências repetitivas nestes cromossomos, de acordo com o mecanismo de evolução catraca de Muller. Além disso, a análise de sequências dos cromossomos B e dos elementos do complemento A

parecem indicar que os cromossomos B de *C. gomesi* estão sob um processo de seleção positiva para o gene da histona H3, indicando a possibilidade de que possam estar sendo transcritos. Tal situação é divergente daquela observada para sequências gênicas presentes em cromossomos B de outras espécies, as quais apresentam uma seleção relaxada que se estabelece sobre estes cromossomos considerados “dispensáveis”. No entanto, tais informações corroboram estudos recentes que apontam para a identificação de transcritos provindo de cromossomos supranumerários em outros organismos.

Técnicas genéticas avançadas e resolutivas que fornecem dados para a análise e caracterização do conteúdo de DNA dos cromossomos B têm sido aplicadas de modo crescente em estudos mais recentes, focados principalmente em aspectos da estrutura molecular destes elementos genômicos, visando melhor compreender aspectos da sua origem, evolução e possíveis funções destes elementos nos organismos portadores. Tendo em vista a presença de sistemas de cromossomos B que provavelmente se originaram de formas distintas no gênero *Characidium*, considera-se que o uso ampliado destas abordagens para um maior número de espécies poderia auxiliar de modo consistente no conhecimento dos diferentes mecanismos de origem, bem como a possível contribuição destes elementos para o perfil transcricional do organismo portador. Desta forma, os estudos apresentados neste trabalho poderão ser de relevância caso haja continuidade na busca de conhecimentos específicos sobre a biologia evolutiva dos cromossomos supranumerários em peixes.

6. Referências bibliográficas

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215: 403-410.
- Ananiev E, Chamberlin MA, Klaiber J, Svitashv S. Microsatellite megatracts in the maize (*Zea mays* L.) genome. *Genome*. 2005; 48: 1061-1069.
- 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*. 2006; 127: 277-284.
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A. Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *Plant Cell*. 2013; 25: 2536-2544.
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, et al & Houben A. Genes on B chromosomes: Old questions revisited with new tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Regulatory Mechanisms*. 2015; 1849(1): 64-70.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; btu170.
- 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*. 2013; 8(6): e 66532.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Pyatkova MS et al. B chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir (Orthoptera, Acrididae) analyzed by chromosome microdissection and FISH. *Folia Biologica Krakow*. 2003; 51: 1-11.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN, Warchalowska-Sliwa E, Tatsuta H, Runtsov NB. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research*. 2007; 15: 315-326.

- Cabrero J, Lo M, Go R, Castro A, Marti A, Camacho J. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*. 1997; 5(3): 194–8.
- Cabrero J, López-León M, Bakkali M, Camacho JPM. Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*. 1999; 83: 435-439.
- Camacho JPM, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J, Shaw MW. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*. 1997; 149(6): 1030-1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 2000; 355: 163-178.
- Camacho JPM. B chromosomes. In: Gregory TR editor. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego. 2005; 223-286.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*. 1998; 72: 1907–1932.
- Castresana J. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*. 2001; 18(4): 465-471.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes): Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*. 2001, 5: 253-260.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*. 2003, 138:213-218.
- Cole CJ, Levans CR. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetological Review* 1971; 3: 102.

- Colgan D, McLauchlan A, Wilson G, Livingston S. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 1998, 46: 419-43.
- Cuadrado A, Jouve N. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*. 2011; 12: 205.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2003; 51(2): 127.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: 1792–1797.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010; 10: 564-567.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1981; 31: 37-144.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA. Supranumerary chromosome system C-banding pattern characterization and multiple Nucleolus Organizing Region in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*. 1989; 79: 107-114.
- Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Research*. 2004; 12: 143-151.
- Hewitt G, John B. The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus*. *Chromosoma*. 1967; 21 (2): 140–62.
- Hewitt G, Ruscoe C. Changes in microclimate correlated with a cline for B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *The Journal of Animal Ecology*. 1971; 40 (3): 753–65.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014; 71: 467-478.

- Hughes AL. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 199; 256: 119-124.
- Jesus CM, Galetti Jr PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*. 2003; 118(1): 25-32.
- Johnson ME, Viggiano L, Bailey JA, Abdul-Rauf M, Goodwin G, Rocchi M, Eichler EE. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature*. 2001; 413(6855): 514-519.
- Jones RN. B-Chromosome drive. *The American Naturalist*. 1991; 137: 430-442.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005; 110(1-4): 462-467.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30(4): 772-780.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86: 6196-6200.
- Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biology*. 2002; 3(2): 1.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*. 2008; 51: 350-356.
- Lamatsch D, Nanda I, Schlupp I, Epplen J, Schmid M, Scharl M. Distribution and stability of supernumerary microchromosomes in natural populations of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenetic and Genome Research*. 2004; 106(2-4): 189-94.

- Lamb JC, Kato A, Birchler JA. Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma*. 2005; 113(7): 337-349.
- Langdon T, Seago C, Jones RN, Ougham H, Thomas H, Forster JW, Jenkins G. De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics*. 2000; 154: 869-884
- Levan A, Fredga K, Sandbreg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52: 201-220.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25: 1451-1452.
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA. Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1993; 134: 1149-1174.
- Long H, Qi ZX, Sun XM, Chen CB, Li XL, Song WQ, Chen RY. Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008; 50: 183-189.
- Lopez-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes, in Garrido-Ramos MA (ed): Repetitive DNA. *Genome Dynamics*. 2012; 7: 1-28.
- López-León M, Cabrero J, Pardo M, Viseras E, Camacho JPM, Santos J. Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). *Heredity*. 1993; 71: 352-352.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics*. 2011; 12:65.
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*. 1998; 104: 1-7.

- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F. Cytogenetic analysis of A-, B- chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia*. 2004; 69: 181-186.
- Makunin AI, Dementyeva PV, Graphodatsky AS, Volobouev VT, Kukekova AV, Trifonov VA. Genes on B chromosomes of vertebrates. *Molecular Cytogenetics* 2014; 7(1): 99.
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Cabrero J, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM. Geographical barriers impeded the spread of a parasitic chromosome. *PloS one*. 2015; 10(6):e0131277.
- Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004; 20: 2471-72.
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organelar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109(33): 13343-13346.
- Matsubara K, Yamada K, Umemoto S, Tsuchiya K, Ikeda N, Nishida C, Chijiwa T, Moriwaki K, Matsuda Y. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). *Chromosome Research*. 2008; 16: 1013-1026.
- McAllister BF, Werren JH. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*. 1997; 106(4): 243–53.
- McQuade L, Hill R, Francis D. B chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia, Pseudocheiridae). 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1994; 66: 155-161.
- Melo BF, Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2011; 9(1), 49-56.

- Menezes-de-Carvalho NZ, Palacios-Gimenez OM, Milani D, Cabral-de-Mello DC. High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. *Molecular Genetics and Genomics*. 2015; 290: 1787-1792.
- 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*. 2000; 85: 1-9.
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. *Science*. 1991; 254: 1773-1776.
- Milani D, Cabral-de-Mello DC. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS One*. 2014; 9(5): e 97956.
- Miyazawa CS, Galetti Jr. PM. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia*. 1994; 59: 73-79.
- Mühlmann-Diaz MC, Ulsh BA, Whicker FW, Hinton TG, Congdon JD, Robinson JF, Bedford. Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2001; 92(1-2): 139-43.
- Nanda I, Schlupp I, Lamatsch DK, Lampert KP, Schmid M, Schartl M. Stable inheritance of host species- derived microchromosomes in the gynogenetic fish *Poecilia formosa*. *Genetics*. 2007; 177(2): 917-26.
- Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*. 2005; 39: 121.
- Noletto RB, Amorim AP, Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*. 2009; 75: 448-453.
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*. 2013; 29: 792-793.

- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics*. 1988; 11: 577-624.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*. 2009, 35: 81-100.
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*. 2010; 8: 77-86.
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*. 2011a; 78: 183-194.
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Karyotypic conservatism in samples of *Characidium cf. zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology*. 2011b, 34: 208-213.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Camacho JPM, Utsunomia R, Silva GJC, Oliveira C, Foresti F. Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish of the genus *Characidium*. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e107169.
- Pendás AM, Morán P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*. 1995, 4: 275 – 276.
- Peng SF, Cheng YM. Characterization of satellite CentC repeats from heterochromatic regions on the long arm of maize B-chromosome. *Chromosome Research*. 2011; 19: 183-191.
- Pennisi E. Genomics encode project writes eulogy for junk DNA. *Science*. 2012; 337(6099): 1159-1161.
- Pineau P, Henry M, Suspène R, Marchio A, Dettai A, Debruyne R, Petit T, Lécu A, Moisson P, Dejean A, Wain-Hobson S, Vartanian JP. A universal primer set for PCR

- amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol.* 2005; 22: 582–588.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1986; 83: 2934-2938.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B. Satellite DNA evolution. *Repetitive DNA.* 2012; 7: 126-152.
- Romero-Fernández I, Casas-Delucchi CS, Cano-Linares M, Arroyo M, Sánchez A, Cardoso MC, Marchal JA. Epigenetic modifications in sex heterochromatin of vole rodents. *Chromosoma.* 2014; 1-11.
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS ONE.* 2012; 7(5): e 36600.
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. Ribosomal DNA is active in different B chromosome variants of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica.* 2013; 141:337–345.
- Ruiz-Estevez M, Cabrero J, Camacho JPM & Lopez-Leon MD. B Chromosomes in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* are present in all body parts analyzed and show extensive variation for rDNA copy number. *Cytogenetic and Genome Research.* 2014; 143(4): 268-274.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado Á, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma.* 2015; 124(2): 221-234.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports.* 2016; 6: 28333.
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma.* 2016; 1-14.

- Salvador LB, Moreira-Filho O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*. 1992; 69: 50-56.
- Santos LP, Castro JP, Francisco CM, Vicari MR, de Almeida MC, Goll LG, Morelli S, Artoni RF. Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*. 2013; 6: 48.
- Sapre A, Deshpande D. Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity*. 1987; 78(3): 191-6.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F. Repetitive DNA Sequences and Evolution of ZZ/ZW Sex Chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). *PloS One*. 2015; 10(9): e0137231.
- Scudeler PES, Diniz D, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F. Whole chromosome painting of B chromosomes of the red-eye tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *Comparative Cytogenetics*. 2015; 9(4): 661.
- Sharbel TF, Green DM, Houben A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome*. 1998; 41: 14-22.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M, et al. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*. 1995; 373 (6509): 68–71.
- Serrano EA, Araya-Jaime C, Suárez-Villota EY, Oliveira C, Foresti F. Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). *Comparative Cytogenetics*. 2016; 10(2): 255-268.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*. 2013; 141 (7-9): 329-336.

- Silva DM, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C & Foresti F. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenetic and genome research*. 2015; 146(2): 144-152.
- Silva DMZA, Daniel SN, Camacho JPM, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Penitente M, Pansonato-Alves JC, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016; 1-12.
- Smit A, Hubley R. RepeatModeler Open-1.0. Repeat Masker Website. 2010.
- Smit A, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-3.0. 2010. See <http://www.repeatmasker.org>.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 1972; 75: 304-306.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24: 1596-1599.
- 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*. 2009; 17: 11-18.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*. 2010; 119:217-225.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*. 1994; 22: 4673-4680.
- 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 Research. 2002; 10: 109-116.
- 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. 2013; 11:90
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BE, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD, Martins C. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. Molecular Biology and Evolution. 2014; 31: 2061–2072.
- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Hashimoto DT, Oliveira C, Trifonov VA, Porto-Foresti F, Camacho JPM, Foresti. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). PloS One. 2016; 11(3): e 0150573.
- Venere PC, Galetti Jr. PM, Miyazawa CS. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. Genetics and Molecular Biology. 1999; 22: 345-349.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). Genetica. 2008; 134: 311–317.
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF. New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. Genetica. 2011; 139: 1073-1081.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N. B Chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. PLoS Genetics. 2011; 7: e 1002203.

Zhang J, Rosenberg HF, Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95: 3708-3713.

Anexo 1: Artigo publicado como parte da tese de Doutorado.

Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae).

Serrano EA, Araya-Jaime C, Suárez-Villota EY, Oliveira C, Foresti F.

Comparative Cytogenetics, versão online (2016)

Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae)

Érica Alves Serrano¹, Cristian Araya-Jaime¹, Elkin Y. Suárez-Villota^{2,3},
Claudio Oliveira¹, Fausto Foresti¹

1 Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil **2** Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile **3** Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Érica Alves Serrano (ericaserrano@ibb.unesp.br)

Academic editor: Petr Rab | Received 26 January 2016 | Accepted 21 March 2016 | Published 18 May 2016

<http://zoobank.org/9622E754-EE80-4D08-B410-42A011B3605D>

Citation: Serrano EA, Araya-Jaime C, Suárez-Villota EY, Oliveira C, Foresti F (2016) Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). *Comparative Cytogenetics* 10(2): 255–268. doi: 10.3897/CompCytogen.v10i2.7939

Abstract

Characidium gomesi Travasso, 1956 specimens from the Pardo River have up to four heterochromatic supernumerary chromosomes, derived from the sex chromosomes. To access the meiotic behavior and distribution of an active chromatin marker, males and females of *C. gomesi* with two or three B chromosomes were analyzed. Mitotic chromosomes were characterized using C-banding and FISH with B chromosome probes. Meioocytes were subjected to immunofluorescence-FISH assay using anti-SYCP3, anti-H3K4m, and B chromosome probes. Molecular homology of supernumeraries was confirmed by FISH and by its bivalent conformation in individuals with two of these chromosomes. In individuals with three Bs, these elements formed a bivalent and a univalent. Supernumerary and sex chromosomes exhibited H3K4m signals during pachytene contrasting with their heterochromatic and asynaptic nature, which suggest a more structural role than functional of this histone modification. The implications of this result are discussed in light of the homology, meiotic nuclear organization, and meiotic silencing of unsynapsed chromatin.

Keywords

Immunodetection, Chromosome painting, SYCP3, synaptonemal complex

Introduction

B chromosomes are genomic structures that are extra to the standard genome set, apparently inert and found throughout animals, plants and fungi (Houben et al. 2014). Although aspects relating to the origin, evolution and function of these chromosomes remain unknown, in some cases they may be derived from autosomes or sex chromosomes (Teruel et al. 2010, Bueno et al. 2013, Pansonato-Alves et al. 2014) or from interspecific crosses (Schartl et al. 1995, McAllister and Werren 1997, Perfectti and Werren 2001). B chromosomes are usually composed of repetitive sequences of DNA, not carrying essential genes (Camacho. 2005, Houben et al. 2014). However, essential gene sequences have been found in some B chromosomes (Banaei-Moghaddam et al. 2013, Ruiz-Estevez et al. 2013, Trifonov et al. 2013), and their presence can generate some phenotypic effects (Houben et al. 2014). During meiosis, B chromosomes show no recombination with A chromosomes, implying a very different evolutionary path (Houben et al. 2014). In addition, B chromosomes are not always found in pairs and do not segregate in a predictable manner during meiosis, which leads to a non-Mendelian segregation in some cases. Even when found in pairs, the transmission rates of B chromosomes are often lower than 0.5 because they are unstable during mitosis and/or meiosis. However, some B chromosomes may show transmission rates higher than 0.5, ensuring their accumulation, an important feature of parasite B chromosomes (Camacho 2000).

The analysis of chromosome pairing during meiosis is a branch of cytogenetic in plants and animals, showing interesting aspects about the chromosome synapsis in the early stages of meiosis (Wallace and Wallace 2003, Basheva et al. 2014, Sanchez-Moran and Armstrong 2014). In particular, the meiotic behavior of B chromosomes has been investigated across different organisms to evaluate aspects of homology, segregation, importance in gamete viability, and transmission to offspring (Fontana and Vickery 1973, Camacho et al. 1980, Jones 1991, Aquino et al. 2013). In *Mazama americana* (Erxleben, 1777), B chromosomes behave as homologous bivalent forms even though they may also occur as univalents, showing erratic behavior responsible for non-Mendelian segregation patterns (Aquino et al. 2013). In fishes bearing four B chromosomes, both the tetravalent conformation and the presence of two bivalents has been witnessed also suggesting homology between these chromosomes. (Pauls and Bertollo 1983, Dias et al. 1998). Meiotic chromosome behavior involves a complex dynamics of chromatin modification playing an essential role in chromosome function and gene regulation (Manterola et al. 2009, Vaskova et al. 2010). In fact, methylation, acetylation, and phosphorylation of the histone nucleosomal core are involved in chromatin assembly, and linked with active and silent transcriptional states during meiosis. For example, the histone H3 methylated at serine 4 (H3K4m) is an epigenetic modification of chromatin that has been linked to gene activation in model organisms, such as mammals (Santos-Rosa et al. 2002, Bernstein et al. 2002, Pokholok et al. 2005, Koina et al. 2009). This modification has been associated to genetic families transcription of

barley B chromosomes (Carchilan et al. 2007) and also with X active chromosome in the X-chromosome inactivation process of mammals (Koina et al. 2009). Thus, this histone modification is a good active chromatin marker to analyze B chromosome behavior during meiosis.

The genus *Characidium* Reinhardt, 1867 comprises a group of interesting fish for cytogenetic and molecular studies because of the ZZ/ZW sex determination system (Maistro et al. 1998, Centofante et al. 2001, 2003, Maistro et al. 2004, Noletto et al. 2009), and the occurrence of supernumerary chromosomes (Maistro et al. 1998, Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a, 2011b). B chromosomes have been found in *Characidium* cf. *zebra* Eigenmann, 1909 (Miyazawa and Galetti Jr 1994, Venere et al. 1999), *Characidium oiticicai* Travassos, 1967, *Characidium pterostictum* Gomes, 1947 (Pansonato-Alves et al. 2010) and *C. gomesi* (Pansonato-Alves et al. 2011a), in different levels of heterochromatinization (Pansonato-Alves et al. 2010, 2011b). Individuals of *C. gomesi* from the Pardo River possess up to four clearly acrocentric B chromosomes of large size, entirely heterochromatic and originating from the sex chromosomes (Pansonato-Alves et al. 2014). Therefore, supernumerary chromosomes of *C. gomesi* represent an interesting model for the study of origin and evolution of these genomic elements in fishes, including chromosome behavior during meiosis, a process less explored in this group of vertebrates.

In this study, we addressed the meiotic behaviour of B chromosomes in specimens of *C. gomesi* by means of molecular cytogenetics and immunodetection techniques. B chromosome paint probes and antibodies against synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) (Lammers et al. 1994) and against methylated histone H3 at lysine 4 (H3K4) (Pokholok et al. 2005, Godmann et al. 2007, van der Heijden et al. 2007, Kouzarides 2007) were used.

Materials and methods

Chromosome preparation

Nine males individuals and seven females of *C. gomesi* collected in the Rio Pardo basin of the Rio Paranapanema, Botucatu, São Paulo, Brazil (22°59'25"S and 48°25'40"W) were analyzed (Table 1). The animals were collected in accordance with Brazilian environmental laws of permission to collect issued by MMA / IBAMA / SISBIO, number 3245. The collection procedures, maintenance and analysis of the animals were performed in accordance with international regulations of animal experiments, followed by the Universidade Estadual Paulista (CEEAA / IBB / UNESP protocol number 304). The animals were anesthetized, dissected and mitotic chromosome preparations were obtained following the protocol described by Foresti et al. (1981). The C-banding was performed in mitotic cells according to Sumner (1972). Gonads were removed and processed for SC visualization according to the technique described by Araya-Jaime et al. (2015).

Table 1. Individuals of *C. gomesi* analysed F: female, M: male

Ind. nº	Sex	Nº of cells with 0-3 Bs			
		0	1	2	3
75231	M	4	15	3	
75232	M	4	15	5	
75233	F	25			
75234	M	23			
75236	F	7	8	4	
75237	M	8	11	8	
75238	M	3	8	15	
75239	M	8	2	9	
75240	M	1	6	10	
75241	F	2	4	11	12
75242	M	20			
75250	F	6	2	6	17
75251	F	15			
75252	F	5	6	7	
75253	M	17			
75254	F	3	11	17	

B chromosome painting in mitotic cells

The B chromosome probe was produced as described by Pansonato-Alves et al. (2014) and hybridized in mitotic cells following the procedure described by Pinkel et al. (1986), under high stringency conditions (200 ng probe, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC at 37 °C overnight).

Immunodetection and FISH in meiotic cells

Meiotic preparations were immersed for 20 min in 0.01 M citrate buffer preheated to 90 °C. Then, they were incubated in a humidified chamber at 37 °C for 1 h as described by Araya-Jaime et al. (2015). Incubation solutions consisted of rabbit antibodies against SYCP3 of medaka fish (Iwai et al. 2006) diluted 1: 100 in PBS, and mouse antibody against the H3K4m histone of rabbit (Abcam, ab8895) diluted 1: 100 in PBS. After washing in PBS, the slides were subjected to a second incubation in a humid chamber with anti-rabbit donkey IgG conjugated with isothiocyanate fluorescein (FITC; Jackson Immuno Research Laboratories) for detecting SYCP3 and anti-mouse goat IgG conjugated with Texas Red (Invitrogen, Cat No. a-31553) for detecting H3K4m, both diluted 1: 100 in PBS for 1 h at room temperature.

Meiotic preparations were hybridized with the B chromosome probe in accordance with the protocol from Pinkel et al. (1986), adapted by Araya-Jaime et al. (2015) after immunodetection to not affect SYCP3 and H3K4m signals. Because FISH can

darken the immunodetection signal, SYCP3 and H3K4m images were captured before the hybridization procedure. Furthermore, the slides were exposed to light before the hybridization to lose the H3K4m signal so that it is not confused with the signals from the B chromosome probe, as this probe was detected with anti-digoxigenin-rhodamine.

Slides were stained with DAPI and mounted with an antifade solution (Vetashield). The images were digitally captured using Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics) with appropriate filters of the epifluorescence microscope (Olympus BX61) equipped with an Olympus DP70 camera. Final composition of the images was performed with the application of Adobe Photoshop CS6 image editor software, using image and uniform size scales.

Results

The *C. gomesi* specimens showed $2n=50$ chromosomes with ZZ/ZW sex chromosomes. In addition, we found individuals with 2–3 acrocentric B chromosomes, with intraindividual number variation (Fig. 1a, Table 1).

All chromosomes of standard complement showed positive C-bands in the pericentromeric region. The W and B chromosomes showed completely dark C-banding, while the Z chromosome showed a large pericentromeric C-band (Figure 1a). Individuals with three supernumerary chromosomes evidenced variation in the amount of heterochromatin between these elements was observed. Chromosome painting with the B chromosome probe demonstrated homology between the B and W chromosomes, as well as with the pericentromeric region of the Z chromosome (Figure 1b).

Twenty-five bivalents corresponding to the A chromosomes were identified by immunodetection with SYCP3 on cells in the pachytene stage of all individuals. Males and females bearing two B chromosomes exhibited cells with 25 and 26 bivalents (Figure 2a). Additionally, two females with three B chromosomes showed 25 and 26 bivalents, plus an univalent in 50% of the cells (Figure 2b, easily recognized by the bright green signal of SYCP3 and positive hybridization with the B chromosome probe), and in some cells, the subterminal regions of the heteromorphic sex chromosomes showed no synapse during the pachytene. H3K4m immunodetection in pachytene presented a dot-like labeling pattern on autosomes, sex and B chromosomes (Figure 3a). Chromo-

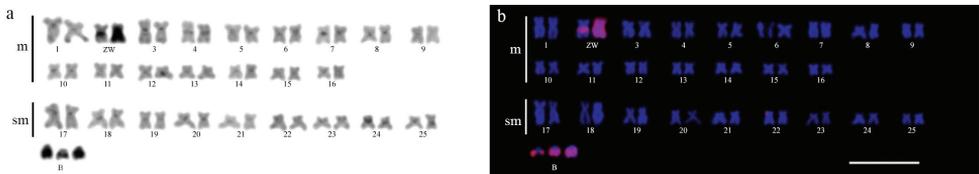


Figure 1. Mitotic karyotype of female *C. gomesi* with three B chromosomes. **a** C-banding. Note heterochromatin pattern on B and sex chromosomes **b** Chromosome painting using a B chromosome probe and contrasted with DAPI. Notice probe hybridization on B and sex chromosomes. Bar = 10 μ m.

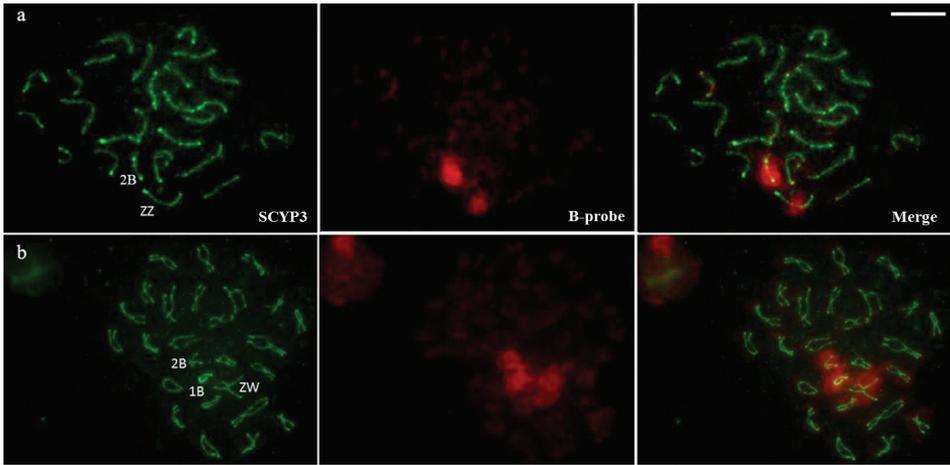


Figure 2. Synaptonemal complex of *C. gomesi* after immunodetection with anti-SCYP3 (green) and chromosome painting with B chromosome probe (red). **a** Male pachytene bearing two B chromosomes. Note the positive hybridization of the B paint probe on the bivalents of the B and Z chromosomes **b** Female diplotene bearing three B chromosomes. Note the presence of a B univalent and the ZW bivalent corresponding to the Z and W chromosomes, all positive for the B probe (right). Bar = 10 μ m.

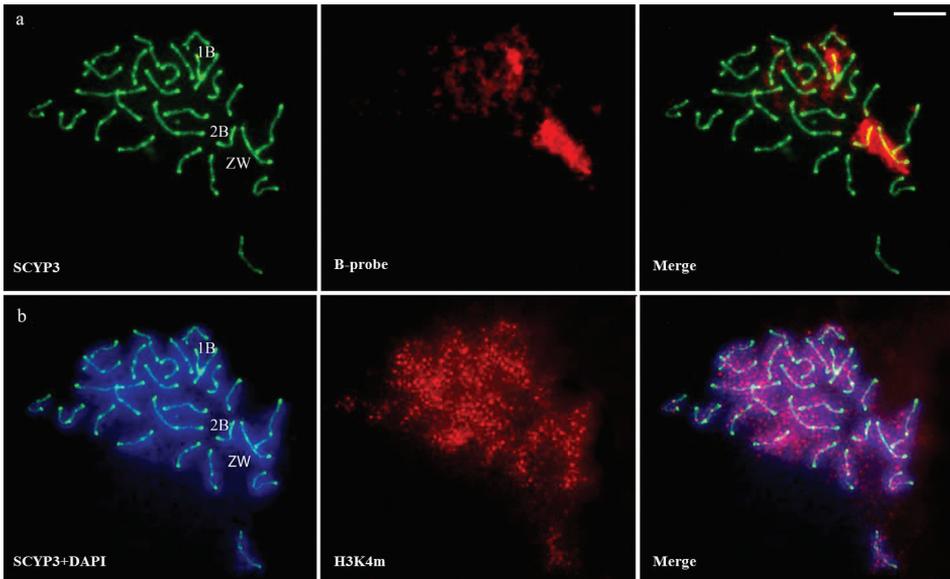


Figure 3. Meiotic cell of *C. gomesi* in pachytene stage with three supernumerary chromosomes. **a** Synaptonemal complex protein identified anti- SYCP3 (green) and B chromosome probe (red). Note the positive hybridization of B paint probe on two bivalents and one univalent (ZW, 2B and 1B, respectively) **b** Synaptonemal complex protein identified with anti-SYCP3 counterstained with DAPI (blue), evidencing ZW bivalent and the meiotic formations of B chromosomes; chromatin regions associated with transcriptional activities identified with anti-H3K4m (red) and DAPI consterstaining (blue) evidencing the ZW bivalent and the meiotic formations of B chromosomes. Bar = 10 μ m.

some painting with the B chromosome probe showed hybridization signals similar to that of mitotic cells (Figure 1b), which corroborates the identification of sex chromosomes (Figures 3b, ZW) and of B chromosomes (Figures 3b, 2B, 1B).

Discussion

The species of the *Characidium* genus have intriguing cytogenetic features because both sex and supernumerary chromosomes can be found in the same individual (Miyazawa and Galetti Jr. 1994, Vicari et al. 2008, Pansonato-Alves et al. 2010, 2011a). Moreover, in some species, such as *C. gomesi*, individuals carry totally heterochromatic B chromosomes (Figure 1), with molecular homology to the sex chromosomes (Pansonato-Alves et al. 2014 and this work). Results of meiotic analysis also demonstrated a perfectly paired bivalent between the two B chromosomes while meiocytes with three supernumerary chromosomes resulted in one bivalent and one univalent of B chromosomes (Figure 2).

Despite sequence homology between B and sex chromosomes in *C. gomesi* (Figures 1b, 2, and 3a; see also Pansonato-Alves et al. 2014), the meiotic figures analyzed revealed that the supernumerary chromosomes do not form a multivalent chromosome (Figures 2b and 2a). This recombination restriction with potential donor chromosomes was observed in other organisms and can be considered a starting point in the process of independent evolution of the extra chromosomes (Houben et al. 2014). However, the bivalent conformation of the B chromosomes (Figures 2 and 3) and the results of chromosome painting in mitotic cells (Figure 1b) reinforce the idea of similarity in the supernumerary elements of *C. gomesi*. The homology between B chromosomes has been observed in meiotic cells of other fish species, such as *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Pauls and Bertollo 1983, Dias et al. 1998, Portela-Castro et al. 2001) and in mammals, such as the American red fox *Vulpes fulvus* (Desmarest, 1820) (Switonski et al. 1987) and the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1907) (Kolomiets et al. 1988). The formation of a multivalent involving B chromosomes was initially suggested by Pauls and Bertollo (1983) in *P. lineatus* and later confirmed by Dias et al. (1998). They noted that some meiotic cells of individuals carrying four B chromosomes would either reveal a tetravalent or two bivalents involving the B chromosomes suggesting homology between these chromosomes.

The chromosome pairing seen in meiosis has been interpreted as homology (Ramsey and Schemske 2002) and observed as occurring also between B chromosomes of *C. gomesi*. However, such a pairing may occur in a variety of contexts (McKee 2004). In *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (McKim and Hayashi-Hagihara 1998) and the roundworm *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (Dernburg et al. 1998), these synapses can occur even in the absence of homologous recognition. Conversely, in the F1 of allotetraploid plants, for example, pairing between homologous chromosomes as well as between homeologous chromosomes occur, which are described as partially homologous chromosomes (reviewed in Ramsey and Schemske 2002). As previously

described, the chromosome pairing seems to not always indicate complete homology between chromosomes. Nevertheless, the synapse between two B chromosomes of *C. gomesi* is considered a crucial condition for chiasmus formation. This formation is mainly composed of physical connections between homologous chromosomes that ensure correct segregation during the first meiotic division (Tsubouchi and Roeder 2003). Furthermore, meiotic recombination caused by the occurrence of crossing-over (Zhang et al. 2014) could be generating a homogenization of the sequences present on both chromosomes; however, a confirmation of late recombination nodules in the B bivalent is required to indicate exchange of genetic material and support this phenomenon.

B chromosomes were detected by hybridization with a probe made from a single supernumerary chromosome (Figures 1b, 2, and 3). However, despite chromosome painting suggested that all supernumerary were composed of similar types of repetitive DNA, one of them did not synapse with the other during pachytene (Figure 2). Even without conclusive evidence about the actual identity of the unsynapsed B chromosomes, the observation of less heterochromatin in one of the supernumerary chromosomes (Figure 1a) could be indicative of the interference of differential heterochromatin composition on the pairing process.

The existence of mechanisms limiting the multivalent pairing between homologous chromosomes was proposed to occur in autopolyploid plants, among which the presence of genetic factors can have a significant effect (see reviewed in Ramsey and Schenske 2002). Therefore, when the B chromosomes carry specific genetic elements, such as the Ph1 gene for example, the pairing of homologous chromosomes may be prevented (Dover and Riley 1972, Kousaka and Endo 2012). When meiosis begins, chromosomes must meet and pair with their counterpart. In this process, the chromosomes are aligned and brought closer, followed by homology recognition and synapsis (McKee 2004, Scherthan et al. 1996, Scherthan 2001). However, this process of meeting between the counterparts during the first meiotic prophase remains largely unknown (Pawlowski and Cande 2005, Da Ines et al. 2014). Thus, the presence of B chromosomes in bivalent and univalent conformation in meiocytes of *C. gomesi* appears to depend not only on the similarity of their sequences but also on their meeting and alignment in the meiotic nucleus.

The lack of pairing of one of the B chromosomes in *C. gomesi* (Figure 2b and 3) was previously observed in other eukaryotic organisms and also linked to the silencing of genes present in these chromosomal regions. In the fungus *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge, 1927 (Shiu and Metzenberg 2002) and mice (Turner et al. 2005), chromosomal regions or entire chromosomes not pairing with their counterpart suffer inactivation and induce silencing during meiotic prophase. This process is called meiotic silencing by unpaired DNA (MSUC) and is believed to protect the genome against the invasion of transposable elements (Shiu and Metzenberg 2002). Such silencing was also observed in small unsynapsed regions of trivalents, resulting from multiple Robertsonian translocations (Manterola et al. 2009) and of sex chromosomes, a process known as meiotic sex chromosome inactivation (MSCI). According

to these observations, it is expected that the univalent B chromosome of *C. gomesi* as well as the unsynapsed region of the sex chromosomes may become inactivated during meiosis since this is a general process observed in other organisms. Studies focusing on transcriptional repression of the B univalent are interesting because they try to confirm this hypothesis.

In mammals, the levels of histone H3 mono-, di- and tri-methylation at lysine 4 is highly dynamic during the development of germ cells. In addition to the possible role of H3K4 methylation in chromatin reorganization, a connection to gene activation has been suggested (Bernstein et al. 2002, Santos-Rosa et al. 2002, Pokholok et al. 2005, Godmann et al. 2007, van der Heijden et al. 2007, Koina et al. 2009). In this study, the presence of histone H3K4m in B chromosomes of *C. gomesi* (Figure 3b) disagrees with the heterochromatic nature of these genomic elements (Figure 1b) since this epigenetic marker shows preferential association with euchromatic regions (Godmann et al. 2007, Koina et al. 2009). This incongruence has been noted before in the B chromosomes of barley which simultaneously present subterminal heterochromatic regions enriched with tri-methylated histone H3K4 and repetitive gene families (D1100 and E3900) that are transcriptionally active (Carchilan et al. 2007).

On the other hand, because the lack of synapsis is strongly related to the meiotic silencing by the unpaired DNA process (MSUC) in several organisms (Turner et al. 2005, Burgoyne et al. 2009, Manterola et al. 2009), the presence of H3K4m on the B univalent of *C. gomesi* may not necessarily be related to transcription. It is noteworthy that the silencing of telomeres (Nislow et al. 1997, Singer et al. 1998) and of rDNA (Briggs et al. 2001, Bryk et al. 2002) is also related to processes involving histone H3 methylation at lysine 4. Therefore, it can be assumed that the presence of this epigenetic marker in the chromosomes of pachytene stage cells of *C. gomesi* may be involved in some of the above processes, in addition to its possible role in the reorganization of chromatin during meiosis.

Acknowledgements

This study was funded by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council for Research and Development (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and by CONICYT, Fondecyt 3160328 to EYS-V. We thank Dr. M. Yamashita for providing the SYCP3 antibody.

References

Aquino CI, Abril VV, Duarte JMB (2013) Meiotic pairing of B chromosomes, multiple sexual system, and Robertsonian fusion in the red brocket deer *Mazama americana* (Mammalia, Cervidae). *Genetics and Molecular Research* 12(3): 3566–3574. doi: 10.4238/2013.September.13.1

- Araya-Jaime C, Serrano EA, de Andrade e Silva DMZ, Yamashita M, Iwai T, Oliveira C, Foresti F (2015) Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. *Molecular Cytogenetics* 8(1): 4. doi: 10.1186/s13039-015-0108-9
- Basheva EA, Torgasheva AA, Fernandez MJG, Boston E, Mirol P, Borodin PM (2014) Chromosome synapsis and recombination in simple and complex chromosomal heterozygotes of tuco-tuco (*Ctenomys talarum*: Rodentia Ctenomyidae). *Chromosome Research* 22(3): 351–363. doi: 10.1007/s10577-014-9429-5
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A (2013) Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *Plant Cell* 25(7): 2536–2544. doi: 10.1105/tpc.113.111856
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Schreiber SL (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13): 8695–8700. doi: 10.1073/pnas.082249499
- Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Allis CD (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development* 15(24): 328–3295. doi: 10.1101/gad.940201
- Bryk M, Briggs SD, Strahl BD, Curcio MJ, Allis CD, Winston F (2002) Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae* by a Sir2-independent mechanism. *Current Biology* 12(2): 165–170. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00652-2
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. *PLoS ONE* 8(6): e66532. doi: 10.1371/journal.pone.0066532
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA (2009) The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics* 10.3: 207–216. doi: 10.1038/nrg2505
- Camacho JPM, Carballo AR, Cabreto J (1980) B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). *Chromosoma* 80(2): 163–176. doi: 10.1007/BF00286298
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philosophical Transaction of the Royal Society B* 355(1394): 163–178. doi: 10.1098/rstb.2000.0556
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR (Ed.) *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, 223–286. doi: 10.1016/b978-012301463-4/50006-1
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Caperta A, Morais-Cecílio L, Houben A (2007) Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *The Plant Cell Online* 19(6): 1738–1749. doi: 10.1105/tpc.106.046946
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2001) Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes): Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54(3): 253–260. doi: 10.1080/00087114.2001.10589233
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138(3): 213–218. doi: 10.1034/j.1601-5223.2003.01714.x

- Da Ines O, Gallego ME, White CI (2014) Recombination-independent mechanisms and pairing of homologous chromosomes during meiosis in plants. *Molecular Plant* 7(3): 492–501. doi: 10.1093/mp/sst172
- Dernburg AF, McDonald J, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM (1998) Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94(3): 387–398. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81481-6
- Dias AL, Foresti F, Oliveira C (1998) Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). *Caryologia* 51(2): 105–113. doi: 10.1080/00087114.1998.10589125
- Dover GA, Riley R (1972) Prevention of pairing of homoeologous meiotic chromosomes of wheat by an activity of supernumerary chromosomes of *Aegilops*. *Nature* 240(5377): 154–161. doi: 10.1038/240159a0
- Fontana PG, Vickery VR (1973) Segregation-distortion in the B-chromosome system of *Tetrigidea lateralis* (say) (Orthoptera: Tetrigidae). *Chromosoma* 43(1): 75–98. doi: 10.1007/BF01256733
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 31(3): 37–144. doi: 10.1159/000131639
- Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguiar V, Di Sauro A, Sette C, Behr R, Kimmins S (2007) Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 77(5): 754–764. doi: 10.1095/biolreprod.107.062265
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 467–478. doi: 10.1007/s00018-013-1437-7
- Iwai T, Yoshii A, Yokota T, Sakai C, Hori H, Kanamori A, et al. (2006) Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Experimental Cell Research* 312(13): 2528–2537. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.04.015
- Jones RN (1991) B-Chromosome drive. *American Naturalist* 137(3): 430–442.
- Koina E, Chaumeil J, Greaves IK, Tremethick DJ, Graves JAM (2009) Specific patterns of histone marks accompany X chromosome inactivation in a marsupial. *Chromosome Research* 17(1): 115–126. doi: 10.1007/s10577-009-9020-7
- Kolomiets OL, Borbiev TE, Safronova LD, Borisov YM, Bogdanov YF (1988) Synaptonemal analysis of B chromosome behaviour in meiotic prophase I in the East-Asiatic mouse *Apodemus peninsulae* (Muridae, Rodentia). *Cytogenetics and Cell Genetics* 48(3): 183–187. doi: 10.1159/000132621
- Kousaka R, Endo TR (2012) Effect of a rye B chromosome and its segments on homoeologous pairing in hybrids between common wheat and *Aegilops variabilis*. *Genes and Genetic Systems* 87(1): 1–7. doi: 10.1266/ggs.87.1
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693–705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Lammers JH, Offenbergh HH, Van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of

- the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Molecular and Cellular Biology* 14(2): 1137–1146. doi: 10.1128/MCB.14.2.1137
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F (1998) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica* 104(1): 1–7. doi: 10.1023/A:1003242020259
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F (2004) Cytogenetic analysis of A-, B- chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69(2): 181–186. doi: 10.1508/cytologia.69.181
- Manterola M, Page J, Vasco C, Berríos S, Parra MT, Viera A, Fernández-Donoso R (2009) A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genetics* 5(8): e1000625. doi: 10.1371/journal.pgen.1000625
- McAllister BF, Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106(4): 243–253. doi: 10.1007/s004120050245
- McKee BD (2004) Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1677(1): 165–180. doi: 10.1016/j.bbexp.2003.11.017
- McKim KS, Hayashi-Hagihara S (1998) Mei- W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes and Development* 12(18): 2932–2942. doi: 10.1101/gad.12.18.2932
- Miyazawa CS, Galetti Jr. PM (1994) First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia* 59(1): 73–79. doi: 10.1508/cytologia.59.73
- Nislow C, Ray E, Pillus L (1997) SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Molecular Biology of the Cell* 8(12): 2421–2436. doi: 10.1091/mbc.8.12.2421
- Noleto RB, Amorin AP, Vicari MR, Artoni R, Cestari MM (2009) An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology* 75(2): 448–453. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02342.x
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology* 8(1): 77–86. doi: 10.1590/S1679-62252010000100010
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F (2011a) Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology* 78(1): 183–194. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02847.x
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2011b) Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology* 34(2): 208–213. doi: 10.1590/S1415-47572011005000005
- Pansonato-Alves JC, Serrano ÉA, Utsunomia R, Camacho JPM, Costa Silva GJd (2014) Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS ONE* 9(9): e107169. doi: 10.1371/journal.pone.0107169

- Pauls E, Bertollo LCA (1983) Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36: 307–314. doi: 10.1080/00087114.1983.10797671
- Pawlowski WP, Cande WZ (2005) Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in Cell Biology* 15(12): 674–681. doi: 10.1016/j.tcb.2005.10.005
- Perfecti F, Werren JH (2001) The interspecific origin of B-chromosomes: experimental evidence. *Evolution* 55(5): 1069–1073. doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00624.x
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(9): 2934–2938. doi: 10.1073/pnas.83.9.2934
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4): 517–527. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.026
- Portela-Castro ALB, Júlio-Júnior HF, Nishiyama PB (2000) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110(3): 277–283. doi: 10.1023/A:1012742717240
- Ramsey J, Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Review of Ecology and Systematics* 33(1): 589–639. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2013) Ribosomal DNA is active in different B chromosome variants of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica* 141(7): 337–345. doi: 10.1007/s10709-013-9733-6
- Sanchez-Moran E, Armstrong SJ (2014) Meiotic chromosome synapsis and recombination in *Arabidopsis thaliana*: new ways of integrating cytological and molecular approaches. *Chromosome Research* 22(2): 179–190. doi: 10.1007/s10577-014-9426-8
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905): 407–411. doi: 10.1038/nature01080
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M, Parzefall J (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373(6509): 68–71. doi: 10.1038/373068a0
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *The Journal of Cell Biology* 134(5): 1109–1125. doi: 10.1083/jcb.134.5.1109
- Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(8): 621–627. doi: 10.1038/35085086
- Shiu PK, Metzberg RL (2002) Meiotic silencing by unpaired DNA: properties, regulation and suppression. *Genetics* 161(4): 1483–1495.
- Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, Meisinger LL, Peterson SE, Goggin C, Gottschling DE (1998) Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150(2): 613–632.

- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75(1): 304–306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Switonski M, Gustavsson I, Höjer K, Plöen L (1987) Synaptonemal complex analysis of the B-chromosomes in spermatocytes of the silver fox (*Vulpes vulpes* Desm.). *Cytogenetics and Cell Genetics* 45(2): 84–92. doi: 10.1159/000132435
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119(2): 217–225. doi: 10.1007/s00412-009-0251-3
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, O'Brien PCM, Perelman PL (2013) Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biology* 11(1): 90. doi: 10.1186/1741-7007-11-90
- Tsubouchi H, Roeder GS (2003) The importance of genetic recombination for fidelity of chromosome pairing in meiosis. *Developmental Cell* 5(6): 915–925. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00357-5
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics* 37(1): 41–47. doi: 10.1038/ng1484
- van der Heijden GW, Derijck AA, Pósfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, de Boer P (2007) Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nature Genetics* 39(2): 251–258. doi: 10.1038/ng1949
- Vaskova EA, Pavlova SV, Shevchenko AI, Zakian SM (2010) Meiotic inactivation of sex chromosomes in mammals. *Russian Journal of Genetics* 46(4): 385–393. doi: 10.1134/S1022795410040010
- Venere PC, Galetti Jr. PM, Miyazawa CS (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology* 22(3): 345–349. doi: 10.1590/S1415-47571999000300010
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134(3): 311–317. doi: 10.1007/s10709-007-9238-2
- Wallace BMN, Wallace H (2003) Synaptonemal complex karyotype of zebrafish. *Heredity* 90(2): 136–140. doi: 10.1038/sj.hdy.6800184
- Zhang J, Zhang B, Su H, Birchler JA, Han F (2014) Molecular mechanisms of homologous chromosome pairing and segregation in plants. *Journal of Genetics and Genomics* 41(3): 117–123. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.003