

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/07/2018.



**ANÁLISE FUNCIONAL DA PRESENÇA DE CROMOSSOMO B, UTILIZANDO O
PEIXE CICLÍDEO *Astatotilapia latifasciata* COMO MODELO**

Diego Ferreira Marques

Botucatu, Julho de 2016

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

**ANÁLISE FUNCIONAL DA PRESENÇA DE CROMOSSOMO B, UTILIZANDO O
PEIXE CICLÍDEO *Astatotilapia latifasciata* COMO MODELO**

Diego Ferreira Marques

Orientador: Cesar Martins

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu, Julho de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Marques, Diego Ferreira.

Análise funcional da presença de cromossomo B, utilizando o peixe ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* como modelo / Diego Ferreira Marques. - Botucatu, 2016

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

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Ciclídeos. 3. Expressão gênica.
4. Transcriptoma. 5. Genômica. 6. Cromossomos.

Palavras-chave: Elemento extra numerário; expressão gênica; genômica funcional; transcriptoma.

**O fracasso jamais te surpreenderá se
sua decisão de vencer for
suficientemente forte.**

Og Mandino

AGRADECIMENTOS

À DEUS.

Palavras não serão suficientes pra demonstrar o porquê que devo agradecer a minha **FAMÍLIA**. Obrigado pelo exemplo de honestidade, sinceridade, caráter e afetividade.

À meus **PAIS** (Ana e Bosco) por terem me ajudado e me apoiado em todas as dificuldades que fui levado a lidar. Obrigado por ser flexíveis e rido quando necessário, e muito obrigado por ainda estarem presentes de forma muito sólida em minha vida apesar da distância.

À meus **IRMÃOS** (Dannylo, Dannyel, Dulcyana) pelo apoio, e pela companhia diária, amo vocês. Abraço também ao cunhado Moisés, cunhadas Jana e Nyra e ainda mais aos meus dois sobrinhos Arthur e João Vitor que me alegram grandemente com seus recadinhos e fotos diárias.

Ao meu **ORIENTADOR** que apostou em mim desde o começo de dando suporte financeiro desde o início quando isso tudo era apenas um sonho.

Aos meus **AMIGOS DO LABORATÓRIO**. Durante esse período convivi mais tempo com vocês do que com minha própria família, muitos de nós seguiremos caminhos opostos mas vou sempre levar os momentos que passamos juntos, os ensinamentos.

Aos meus **AMIGOS QUE A VIDA UNIU** em especial Leonardo Mendes, Carina Leonelli e Lívia Silveira (UNESP), Adriane, Luiza, Rodrigo, Vânia e minhas parceiras da UNZER Carol e Tati!! além de muitos outros fora da universidade que deixaram os momentos mais leves e divertidos. Um muito obrigado a minhas amigas e parceiras Vanda e Dona Terezinha!!!!

Gostaria de agradecer também aos órgãos que forneceram apoio financeiro para realização desse trabalho: FAPESP (processo 2012/16288-0), CAPES e CNPq.

MUITO OBRIGADO!!!!

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
1.1 Cromossomos supernumerários.....	9
1.2 Peixes ciclídeos como modelo para estudos de biologia evolutiva.....	11
1.3 O ciclídeo <i>Astatotilapia latifasciata</i> como modelo para estudos de cromossomos B	12
1.4 Transcriptomas na elucidação de aspectos funcionais celulares	14
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral e Justificativa	16
2.2 Objetivos específicos	17
3. Hipótese.....	17
4. Materiais e Métodos	18
4.1 Obtenção das amostras de RNA	18
4.2 Genotipagem de animais B+ e B-.....	18
4.3 Extração do RNA total	19
4.4 Sequenciamento e processamento dos <i>reads</i>	19
4.5 Montagem <i>de novo</i>	20
4.6 Diferencial de expressão, identificação de transcritos redundantes entre as amostras e anotação funcional.....	21
5. Resultados e discussão	22
6. Conclusões.....	37
7. Referências Bibliográficas.....	38

Resumo

Os cromossomos supernumerários (cromossomos B) são elementos extras, não homólogos ao complemento A e já foram descritos em uma gama de espécies representando os principais grupos de eucariotos. Estudos com esses elementos têm sido mais direcionados as investigações em nível estrutural, sendo que aspectos funcionais têm sido pouco explorados. Dentre as espécies de peixes, os ciclídeos tem recebido grande interesse científico uma vez que sofreram um rápido e extenso processo de radiação adaptativa e até o momento, cromossomos B já foram descritos em 21 espécies de ciclídeos, variando em quantidade de um a três. Considerando os aspectos citados, atrelados à possibilidade do uso de ferramentas que integram dados funcionais, genômicos e citogenéticos, o presente projeto visou analisar o perfil transcricional de tecidos-alvo de *A. latifasciata* afim de investigar possíveis interferências motivadas pelo cromossomo B relacionadas ao nível de transcrição em indivíduos com presença ou ausência desse elemento extra. Uma gama de genes diferencialmente expressos evidenciada nos tecidos analisados, mostra que B cromossomo pode interferir em diferentes vias fisiológicas da célula. Os resultados mostraram grande contribuição para a discussão sobre a importância funcional do cromossomo B, identificando vários genes relacionados ao ciclo celular, manutenção da estrutura celular e resposta imune. Foram identificados genes altamente expressos localizados no B, o que mostra sua interferência direta. Entretanto a maioria dos genes diferencialmente expressos estão localizados nos cromossomos do complemento normal, cuja função está sendo afetada pela presença deste elemento. Outro ponto importante foi a observação de uma possível ação de repressão do cromossomo B em testículo e aumento dos níveis de expressão em ovário, sugerindo uma possível ação no mecanismo de "drive" desse cromossomo nos gametas femininos.

Palavras-chave: Elemento extra numerário, expressão gênica, transcriptoma, genômica funcional.

Abstract

Supernumerary chromosomes (B chromosomes) are extra elements, not homologous to the A complement and have been described in a range of species in eukaryotes. Studies with these elements have been focused in structural level, and functional aspects have been poorly explored. Among fish species, cichlids have gaining scientific interest because the rapid and extensive adaptive radiation process occurred in the group and B chromosomes have been described in 21 cichlid species, ranging in number from one to three. Considering these aspects, linked to the possibility of using tools that integrate functional and genomic data and cytogenetics, we aimed to analyze transcriptional profiles of target tissues of *A. latifasciata* in order to investigate possible interference motivated by B chromosome related to the transcript expression levels in individuals with the presence or absence of this extra element. A range of genes differentially expressed evidenced in the analyzed tissues shows that B chromosome may be interfering in different pathways. The results contributed to the discussion of functional aspects of B chromosome, identifying several genes related to cell cycle, maintenance of cell structure and immune response. Highly expressed genes located on B were identified. However, the majority of highly expressed genes is located on chromosomes of the normal complement and seems to be affected by the presence of B. Furthermore, our data suggest a possible repressive action of B chromosome in tests and increasing expression genes in ovarian confirming the action of drive mechanism of this chromosome in female gametic cells.

Keywords: Extra Element, gene expression, transcriptome, functional genomics.

1. Introdução

1.1 Cromossomos supernumerários

Os cromossomos B, também conhecidos como elementos supernumerários, não são homólogos aos cromossomos do complemento normal (complemento A) (Jones e Rees 1982). São descritos como “elementos egoístas” (Wilson, 1907) e podem ser encontrados em alguns indivíduos de uma mesma população e não em outros, o que os caracterizam como elementos não essenciais e dispensáveis (revisado em Burt and Trivers, 2006). Esses cromossomos são descritos como elementos parasitas e o genoma de indivíduos portadores do B é classificado como “hospedeiro” (Camacho *et al.* 2000). Seu surgimento pode estar diretamente relacionado a rearranjos cromossômicos do tipo fusão e fissão ou à partir da geração de indivíduos híbridos através do cruzamento entre espécies próximas (Camacho, 2000).

Quanto a composição genômica, em geral são heterocromáticos e compostos basicamente de elementos repetitivos, esse enriquecimento de sequências mostra-se frequente; pode causar a inativação de genes, modificar a ordem e a estrutura gênica e assim, ocasionar a gradual degeneração deste cromossomo por exemplo (Camacho *et al.* 2000; Valente *et al.* 2014).

Análises estruturais descrevem a presença de regiões eucromáticas com descrição de genes nucleares e ribossomais (Rajicic *et al.* 2015), como famílias multigênicas de RNAr 45S (Loreto *et al.* 2008; Fantinatti *et al.* 2011), sequências de microssatélites (Piscor and Parise-Maltempo 2016) e histonas (López-León *et al.* 2008; Teruel *et al.* 2010; Bueno *et al.* 2013; Silva *et al.* 2014; Utsunomia *et al.* 2016), entre outros, que podem interferir no genoma de seus hospedeiros (Graphodatsky *et al.* 2005; Coleman *et al.* 2009; Acosta and Moscone 2011; Valente *et al.* 2014).

Os cromossomos B tendem a se manter na população e dentre os mecanismos que facilitam essa permanência ressalta-se o “drive”. Nesse processo o B dirige-se durante a meiose na fêmea movendo em direção ao ovócito, escapando assim de uma possível eliminação; em outros casos o B mantêm-se destruindo cromossomos do complemento A, como no caso de *Nasonia vitripennis*, por processos ainda não claramente elucidados (revisado em Burt and Trivers, 2006; Pereira *et al.* 2009; Akbari *et al.* 2013). Em sua maioria, os cromossomos B se beneficiam da não disjunção como parte de seu mecanismo de auto-acumulação (revisado em Burt and Trivers, 2006; Lin *et al.* 2014).

No grupo de peixes, estudos citogenéticos os têm revelado em distintas populações de diversas espécies; estes variam em tamanho, frequência e composição. Os estudos estão, em sua maioria, restritos a análises convencionais envolvendo descrição da presença e frequência deste polimorfismo além da sua natureza eucromática/heterocromática (Mestriner *et al.* 2000; Ziegler *et al.* 2003; Poletto *et al.* 2010a; Voltolin *et al.* 2010; Fantinatti *et al.* 2011, Silva *et al.* 2014; Valente *et al.* 2014; Rajicic *et al.* 2015).

Apesar da idéia de ser um elemento inerte, atualmente há muitos relatos da influência do cromossomo B na modulação gênica do hospedeiro (Martis *et al.* 2012; Huang *et al.* 2016). Estes cromossomos podem estar envolvidos em recombinação ectópica entre diferentes cromossomos e estarem envolvidos no movimento de DNAs de organelas para os cromossomos B (Martis *et al.* 2012; Valente *et al.* 2014). Estudos recentes relatam que esses cromossomos podem ter originado cromossomos sexuais e também possuem um papel vital na determinação sexual em algumas espécies de peixes e insetos (Yoshida *et al.* 2011; Martis *et al.* 2012; Houben *et al.* 2013; Akbari *et al.* 2013; Valente *et al.* 2014).

Não obstante o maior conhecimento do cromossomo B ser relacionado apenas a sua questão estrutural, alguns estudos mostram interferência transcricional direta desse elemento. No estudo em *Drosophila albomicans* foi evidenciado transcritos do cromossomo B (Zhou *et al.* 2012), além dos trabalhos com o roedor (*Capreolus pygargus*) (Trifonov *et al.* 2013), com centeio (*Secale cereale*) (Carchilan *et al.* 2007; Carchilan *et al.* 2009; Banai-Moghaddan *et al.* 2013; 2015), em milho (*Zea mays L.*) (Jin *et al.* 2016) e no gafanhoto (*Eyprepocnemis plorans*) (Teruel *et al.* 2010; Ruiz-Estévez *et al.* 2012) ambos evidenciando transcritos específicos provenientes do cromossomo B, atestando sua interferência direta no genoma “hospedeiro”.

Apesar das evidências da funcionalidade do cromossomo B em espécies de animais, plantas e insetos tanto em nível direto quanto na modulação de genes do complemento A (Carchilan *et al.* 2007; Carchilan *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2012; Akbari *et al.* 2013; Trifonov *et al.* 2013; Jin *et al.* 2016) o que se observa é ainda um nível de investigação pontual no qual as análises são restritas a poucas regiões e/ou determinados genes, fornecendo assim informações interessantes, entretanto, de certa forma limitadas.

Nesse panorama, o grupo de peixes que vem ganhando mais destaque no estudo e análise a cerca do cromossomo B, refere-se a família cichlidae. Na qual, dentre as características mais marcantes desse grupo citam-se sua rápida evolução adaptativa além da descrição de inúmeras espécies portadoras desse elemento extra numerário em seu genoma (revisado por Kocher, 2004; Yoshida *et al.* 2011; Brawand *et al.* 2014). Outro fator importante

que auxilia a análise comparativa refere-se a disponibilidade de genomas de referência de vários indivíduos dessa família permitindo análises em larga escala.

6. Conclusões

Atualmente, cromossomos B vem ganhando maior foco nas investigações cromossômicas, afim de identificar os mecanismos pelos quais se mantém no genoma dos hospedeiros. Até o momento, pouco foi esclarecido quanto ao seu comportamento na célula e as maiores descobertas estão relacionadas ao seu conteúdo gênico ou em identificações funcionais de forma pontual, restrita a sequências específicas.

No presente estudo foi evidenciado através da análise em larga escala de RNA uma possível interferência do cromossomo B no genoma do seu hospedeiro, não só contribuindo através de uma ação direta, com a expressão de genes e sequências presentes no cromossomo B, como também modulando a transcrição de genes presentes no complemento A. Outro ponto importante foi a utilização de uma abordagem técnica de montagem, a qual pode ser reproduzida e utilizada como modelo em montagens de transcriptomas de amostras que possuem elementos extra numéricos em seu genoma.

Além dos resultados encontrados, o desenvolvimento do estudo propiciou um ganho extra para aquisição de dados de RNA que já estão sendo utilizados para abordagens funcionais em outros trabalhos que utilizam *A. latifasciata* como modelo, enriquecendo e contribuindo ainda mais para o conhecimento mais preciso do comportamento do cromossomo B na célula bem como seus mecanismos de manutenção e estabilidade durante os ciclos de divisão celular meiótico e mitótico.

7. Referências Bibliográficas

- Adnadevic T, Jovanovic VM, Blagojevic J, Budinski I, Cabrilo B, Bijelic-Cabrilo, Vujosevic M (2014). Possible Influence of B Chromosomes on Genes Included in Immune Response and Parasite Burden in *Apodemus flavicollis*. Plos one. 9:11.
- Akbari OS, Antoshechkin I, Hay BA, Ferree PM (2013). Transcriptome Profiling of *Nasonia vitripennis* Testis Reveals Novel Transcripts Expressed from the Selfish B Chromosome, Paternal Sex Ratio. *Genes Genomes Genetics*. 3: 1597-1605.
- Anders S, Huber W (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 11:R106.
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A (2013). Formation and Expression of Pseudogenes on the B Chromosome of Rye. *The Plant Cell*. 25: 2536–2544.
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas JC, Gundlach HB, Himmelbach AA, Altschmied LA, Mayer KFXB, Houben A (2015). Genes on B chromosomes: Old questions revisited with new tools. *Biochimica et Biophysica*. 64–70
- Basheva EA, Torgasheva AA, Sakaeva GR, Bidau C, Borodin PM (2010). A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). *Chromosome Research*. 18:689–696.
- Becker M, Kuhse J, Kirsch J (2013). Effects of two elongation factor 1A isoforms on the formation of gephyrin clusters at inhibitory synapses in hippocampal neurons. *Histochemistry and Cell Biology* 140.6: 603–9.
- Beukeboom LW (1994). Bewildering Bs: An impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*. 73: 928-996.
- Brawand D, Wagner CE, Li YI, Malinsky M, Keller I et al. (2014). The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature*. 513: 375–381.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos ONE* 8: e66532.
- Burt, Trivers (2006). *Genes in Conflict: The Biology of Selfish Genetic Elements*. Copyright. 613: 325-380.
- Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Takajima RT, Martins C (2012). Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research*. 20:279-292.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000). B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B*. 355: 163-178.
- Camacho, J.P.M. (2005). B chromosomes. In T.R. Gregory. *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier. 223–86.
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Carpetta A, Morais-Cecílio L, Jones RN, Viegas W, Houben A (2007). Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell*. 19:1738–1749
- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A (2009). Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma*. 118:607–616
- Castillo G, Buell R (2013). *Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence*. RSC Publishing.
- Chang X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari CC, Nagahama Y (2005). Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol*. 141: 101–115.
- Cnaani A, Lee BY, Zilberman C, Ozouf-Costaz C, Hulata G, Ron M, D'Hount a, Baroiller JF, Cotta HD, Peuman DJ, Tomasino E, Coutanceau JP, Pepey E, Shirak A, Kocher TD (2008). Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sexual Development*. Karger AG. 2:43-54.
- Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 448: 445-453.
- Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C (2011). Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica*. 139: 1273-1282.
- Feldberg E, Bertollo LAC (1984). Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeonhagus balzani*. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, SP. VIII:639-645.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC (2003). Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In *Fish adaptations* Edited by: Val AL, Kapoor BG. New Delhi and New York: Science Publishers. 285-308.

- Feldberg E, Porto JIR, Brinn MNA, Mendonça MNC, Benzaquem DC (2004). B-Chromosomes in Amazonian Cichlid species. *Cytogenetic and Genome Research*. 106:195-198.
- Ferreira IA and Martins C (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*. 39: 411-418.
- Ferreira PG, Patalano S, Chauhan R, Ffrench-Constant R, Gabaldón T, Guigó R, Sumner S (2013). Transcriptome analyses of primitively eusocial wasps reveal novel insights into the evolution of sociality and the origin of alternative phenotypes. *Genome Biology*. 14:R20.
- Franks TK, Houben A, Leach CR, Timmis JN (1996). The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomata*. *Chromosoma*. 105: 223-230.
- Gentleman RC, Gentleman RC, Carey VJ, Carey VJ, Bates DM, Bates DM, *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 5:R80.
- Gómez-López S, Lerner RG, Petritsch C (2014). Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol. Life Sci*. 71:575–597.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, *et al.* (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res*. 36:3420–35.
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, Trifonov VA, Vorobieva NV, Beklemisheva VR, Perelman PL, Graphodatskaya DA, Trut LN, Yang F, Ferguson-Smith MA, Acland GM and Aguirre GD (2005). The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Research*. 13:113-122.
- Grewal, S. I. S. & Elgin, S. C. R. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399–406.
- Gutknecht J, Sperlich D, Bachmann L (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma*. 103:539-544.
- Haas BJ, Salzberg SL, Zhu W, Pertea M, Allen JE, Orvis J, White O, Buell CR, Wortman JR (2008). Automated eukaryotic gene structure annotation using Evidence Modeler and the Program to Assemble Spliced Alignments. *Genome Biol*. 9:R7
- He B, Zhao S, Chen Y, Cao Q, Wei C, Cheng X, Zhang Y (2015). Optimal assembly strategies of transcriptome related to ploidies of eukaryotic organisms. *BMC Genomics*. 16:65
- Hewitt EW (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 110, 163-169.
- Hoehn PACT, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen RHAM, de Menezes RX, Boer JM, van Ommen GJB, den Dunnen JT (2008). Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic Acids Res*. 36:21.
- Huang X, Madan A (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 9:868–877.
- Huang W, Du Y, Zhao X, Jin W (2016). B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biol* 16:88
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang D-D, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y (2007). Sexual Dimorphic Expression of Gene in Gonads during early differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Bio Reprod*. 78:333–341.
- Jamilena M, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M (1994). A molecular análisis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *J Cell Sci*. 107:703-708.
- Jones RN, Rees H (1982). B chromosome. New York: Academic Press.
- Jones RN (1991). B-chromosome drive. *American Naturalist*. 3:430-442.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*. 110:462–467
- Kassahn KS, Crozier RH, Pörtner HO and Caley MJ (2009). Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organization. *Biology Reviews*. 84: 277-292.
- Kayano H (1957). Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMC's. *Proc Japan Acad*. 33: 553558.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y (2002). Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Elsevier Science Ireland Ltd*. 111:167-171.
- Kocher TD (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Rev Genet*. 5:288-98.
- Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J (2006). Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor. *BMC Bioinformatics*. 7:474.
- Krovel AV and Olsen LC (2002). Expression of a *vas:EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Elsevier Science Ireland Ltd*. 116:141-150.
- Kumar S and Blaxter ML (2010). Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data. *BMC Genomics* 11:571.

- Kuroiwa A, Terai Y, Kobayashi N, Yoshida K, Suzuki M, Nakanishi A, Matsuda Y, Watanabe M, Okada N (2013). Construction of chromosome markers from the Lake Victoria cichlid *Paralabidochromis chilotes* and their application to comparative mapping. *Cytogenetic Genome Research*. 142:112–120.
- Logan C and Buckley BA (2015). Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. *The Company of Biologists*. 218:1915-1924.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Camacho JPM (2008). Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res*. 121: 260-265.
- Loreto V, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM, Souza MJ (2008). Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research*. 16:233-241.
- Losada A, Hirano T (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes*. 11:1269–1287
- Lin HZ, Lin WD, Lin CY, Peng SF, Cheng YM (2014). Characterization of maize B-chromosome-related transcripts isolated via cDNA-AFLP. *Chromosoma* 123: 597-607.
- Maina JN (2000). The highly specialized secretory epithelium in the buccal cavity of the alkalinity adapted Lake Magadi cichlid, *Oreochromis alcalicus grahamsi* (Teleostei: Cichlidae): a scanning and transmission electron microscope study. *J Zool Lond*. 251:427-438.
- Macarulla T, Ramos FJ, Tabernero J (2008). Aurora kinase family: a new target for anticancer drug. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 3:114–122.
- Maki T, Grimaldi AD, Fuchigami S, Kaverina I, Hayashi I (2015). CLASP2 Has Two Distinct TOG Domains That Contribute Differently to Microtubule Dynamics. *J Mol Biol*. 427:2379–2395.
- Mardis ER (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*. 470:198-203.
- Mareco EA, Serrana DGL, Johnston IA, Dal-Pai-Silva M (2015). Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC Genomics*. 16:182.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 18(9):1509-1517.
- Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG, Pinhal D (2011). Animal genomes under the focus of cytogenetics. 1. ed. Hauppauge: Nova Science Publisher. 1:160.
- Martins C (2012). Projeto de pesquisa: Integrando citogenética e genômica na compreensão da estrutura e evolução de cromossomos B em eucariotos utilizando o peixe ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* como modelo. Relatório Científico Anual. FAPESP.
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Julio HF Jr (1995) Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia*. 60:223–231.
- Martins MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Simková H, Novák P, Neumann P, Kubaláková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Dolezel J, Stein N, Mayer KFX, Houben A (2012). Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *PNAS*. 109:13343–13346.
- Nasmyth K, Haering CH (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem*. 74: 595–648.
- Mazzuchelli J, Yang F, Kocher T, Martins C (2011). Comparative cytogenetic mapping of Sox2 and Sox14 in cichlid fishes and inferences on the genomic organization of both genes in vertebrates. *Chromosome Research*. 19:657-667.
- McLoughlin DM, Miller CCJ (1996). The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system. *Federation of European Biochemical Societies*. 397:197-200.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JP (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*. 85:1-9.
- Montgomery EA, Huang SM, Langley CH, Judd BH (1991). Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: genome structure and evolution. *Genetics*. 129:1085-1098.
- Moreton J, Dunham SP, Emes RD (2014). A consensus approach to vertebrate de novo transcriptome assembly from RNA-seq data: assembly of the duck (*Anas platyrhynchos*) transcriptome. *Frontiers in Genetics*. 5:190.
- Morrissey C, Schwefel D, Ennis-Adeniran V, Taylor IA, Crow YJ, Webb M (2015). The eukaryotic elongation factor eEF1A1 interacts with SAMHD1. *The Biochemical Journal*. 466. 1: 69–76.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 5(7):621-628.
- Nachtigall I, Tamarkin A, Tafelski S, Weimann A, Rothbart A, Heim S, Wernecke KD, Spies C (2014). Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients. *J Int Med Res* 42.1: 93–110.

- Nelson J.S. Fishes of the world, 4thed (John Wiley and Sons, Inc. New York 2006).
- Nokkala S, Kuznetsova V, Maryanska-Nadachowska A (2000). Achiasmata segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of psyllids (Psylloidea: Homoptera). *Genetica*. 108:181-189.
- Nur U, Werren JH, Eickbush DG, Burke WD, Eickbush TH (1988). A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science*. 240:512-514.
- Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH and Jiggins FM (2008). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 364, 99–115.
- Ohashi H, Umeda N, Hirazawa N, Ozaki Y, Miura C, Miura T (2007). Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogean, *Neobenedeniagirellae*. Elsevier Science Ireland Ltd. 37:515-523.
- Oliveros JC (2007-2015). Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*. 22. (2): 153–83.
- Pereira HS, Barão A, Caperta A, Rocha J, Viegas W, Delgado M (2009). Rye Bs disclose ancestral sequences in cereal genomes with a potential role in gametophyte chromatid segregation. *Molecular and Biology Evolution*. 26:1683–1697.
- Piscor D & Parise-Maltempi PP (2016). Microsatellite Organization in the B Chromosome and A Chromosome Complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species. *Cytogenet Genome Res*.
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C (2010a). The B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis obliquoidens* harbors 18S rRNA genes. *BMC Genetics*. 11:1.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD, Martins C (2010b). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*. 11:5-10.
- Puertas MJ (2002). Nature and evolution of B chromosomes in plants: A noncoding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet Gen Res*. 96:198-205.
- Pyburn TM, Bensing BA, Xiong YQ, Melancon BJ, Tomasiak TM, Ward NJ, *et al.* (2011). A Structural Model for Binding of the Serine-Rich Repeat Adhesin GspB to Host Carbohydrate Receptors. *PLoS Pathog*. 7:7.
- Rajicic M, Adnadevic T, Stamenkovic G, Blagojevic J, Vujosevic M (2015). Screening of B chromosomes for presence of two genes in yellow-necked mice, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia). *Genetika*. 47-1: 311-321.
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2012). B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLOS ONE* 7(5).
- Salem M, Silverstein J, Rexroad III C and Yao J (2007). Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*. 8:328.
- Sánchez C, Weber G, Gao G, Cleveland B, Yao J, Rexroad III C (2011). Generation of a reference transcriptome for evaluating rainbow trout responses to various stressors. *BMC Genomics*. 12:626.
- Santure A, Gratten J, Mossman J, Sheldon B, Slate J (2011). Characterization of the transcriptome of a wild great tit *Parus major* population by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 12:283.
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E (2012). Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics Advance*.
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E and Pascual M (2014). Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC Genomics*. 15:167.
- Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston I (2012). Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. 13:181.
- Schwartz JH (2001). The many dimensions of cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98. 24: 13482–4.
- Schröder NW, Schumann RR (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 5. 3: 156–64.
- Silva D, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F (2014). Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *Plos one*. 9:1-10.
- Skelton, P (2001). A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa. 2th. New Holland publishing. South Africa.
- Slotkin, R. K. & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet*. 8, 272.
- Smith LW, Chakrabarty P, Sparks JS (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24:625–641.

- Sparks JS, Smith WL (2004). Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics*. 20:501-517.
- Staiger D (2015). Shaping the Arabidopsis Transcriptome through Alternative Splicing. *Advances in Botany*. 13.
- Steeves G, Hansen D, Lamboj A (2010). Cichlids of Africa. Vol. I: Haplochromines. Grandã Publishing.
- Stabach PR, Morrow JS (2000). Identification and Characterization of β V Spectrin, a Mammalian Ortholog of Drosophila β H Spectrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:21385–21395.
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Poletto AB, Venere PC, Martins C (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichlakelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Research*. 125:224-234.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JP (2010). B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*. 119:217-225.
- The International Cichlid Genome Consortium (2006). Genetic basis of vertebrate diversity: the cichlid fish model.
- Traeger LL, Volkening JD, Moffett H, Gallant JR, Chen P, Novina CD, Junior GNP, Anand R, Wells GB, Pinch M, Güth R, Unguez GA, Albert JS, Zakon H, Sussman MR, Samanta MP (2015). Unique patterns of transcript and miRNA expression in the South American strong voltage electric eel (*Electrophorus electricus*). *BMC Genomics*. 16:243.
- Trewavas E (1983). Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum, Natural History, London.
- Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y (2006). SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7.10: 782–8.
- Utsunomia R, Silva DMZdA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, et al. (2016) Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLoS One* 11: e0150573
- Uzer et al. (2015). Cell mechanosensitivity to extremely low magnitude signals is enabled by a LINCed nucleus. *Stem Cells*. 33. 6:2063–2076.
- Valente GT, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E, Martins C (2009). Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research*. 17:791–799.
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, Cabral-de-melo DC, Carvalho R, Vicari MR, Kocher TD, Martins C (2014). Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses. *Molecular Biology Evolution*.
- Viana J, Pidsley R, Troakes C, Spiers H, Wong CCY, Al-Sarraj S, Craig I, Schalkwyk, Mill J (2014). Epigenomic and transcriptomic signatures of a Klinefelter syndrome (47,XXY) karyotype in the brain. *Epigenetics*. 4:587–599.
- Viñas J, Piferrer F (2008). Stage-Specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biology of Reproduction*. 79:738-747.
- Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskis A (2011). A comprehensive transcriptome and immunegene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics*. 12:308.
- Voltolin TA, Laudicina A, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F (2010). Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica*. 138:11-12.
- Wang D-S, Kobayashi T, Zhou Y, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K-I, Nagahama Y (2007). Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol*. 21:712–725.
- Wilson EB (1907). The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science*. 26:870-871.
- Wu TD, Watanabe CK (2005). GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*. 21:1859–1875.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N (2011). B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *Plos Genetics*. 7:8.
- Yu K, Yu Y, Tang X, Chen H, Xiao J, Su X (2016). Transcriptome analyses of insect cells to facilitate baculovirus-insect expression. *Protein Cell*. 7(5):373–382.
- Zhou Q, Zhu H, Huang Q, Xuan Z, Zhang G, Zhao L, Ding Y, Roy S, Vicoso B, Ruan J, Zhang Y, Zhao R, Mu B, Min J, Zhang Q, Li J, Luo Y, Liang Z, Ye C, Li R, Zhang X, Wang J, Wang W, Bachtrog D (2012). Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. *BMC Genomics*. 13:109.

Zerbino DR, Birney E (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 18:821–829.

Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *ChromosResearch* 11:23-35.