

CROMOSSOMOS B: OCORRÊNCIA NOS PEIXES  
NEOTROPICAIS E SUA DISTRIBUIÇÃO EM  
*Prochilodus lineatus*

**MANOLO PENITENTE**

**BOTUCATU - SP**

**2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

CROMOSSOMOS B: OCORRÊNCIA NOS PEIXES  
NEOTROPICAIS E SUA DISTRIBUIÇÃO EM  
*Prochilodus lineatus*

**DOUTORANDO: MANOLO PENITENTE**

**ORIENTADOR: FABIO PORTO-FORESTI**

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

**BOTUCATU - SP**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Penitente, Manolo.

Cromossomos B : ocorrência nos peixes neotropicais e sua distribuição em *Prochilodus lineatus* / Manolo Penitente. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Fabio Porto-Foresti  
Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. *Prochilodus lineatus*. 3. Genética de populações. 4. Cromossomos. 5. Citogenética. 6. Marcadores genéticos.

Palavras-chave: Curimba; citogenética; cromossomos supranumerários; genética de populações; marcadores moleculares.



*Se você olhar para isso, você vê um ponto. É aqui. É nosso lar. Somos nós. Nele, todos que você ama, todos que você conhece, todos de quem você já ouviu falar, todo ser humano que já existiu, viveram suas vidas. A totalidade de nossas alegrias e sofrimentos, milhares de religiões, ideologias e doutrinas econômicas, cada caçador e saqueador, cada herói e covarde, cada criador e destruidor da civilização, cada rei e plebeu, cada casal apaixonado, cada mãe e pai, cada criança esperançosa, inventores e exploradores, cada educador, cada político corrupto, cada “superstar”, cada “líder supremo”, cada santo e pecador na história da nossa espécie viveu ali, em um grão de poeira suspenso em um raio de sol.*

*Carl Sagan*

*Dedico ao meu irmão Murilo (in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

---

O meu agradecimento é dedicado às instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido.

Ao Programa de Doutorando Sanduíche no Exterior (PDSE) vinculado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida (Processo: 88881.132467/2016-01).

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e à Seção de Pós-Graduação do IBB pelo apoio.

À Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Bauru e ao Departamento de Ciências Biológicas pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio) pela grandiosa colaboração para a realização deste trabalho.

Ao professor Fabio Porto-Foresti, pela grande oportunidade oferecida durante todos estes anos de Lagenpe. Obrigado pela atenciosa orientação, pelo apoio, incentivo e confiança durante minha formação.

Ao professor Fausto Foresti, pelo incentivo, auxílio e valiosos ensinamentos que sempre serão de grande valia no meu caminho científico.

Ao Pesquisador José Augusto Senhorini pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos durante a Iniciação Científica e Mestrado, pelo trabalho realizado junto ao CEPTA/ICMBio o qual foi de fundamental importância para a concretização desta tese.

Ao professor Manuel Vera e sua esposa Ana, pela amizade e por me acolherem tão bem em sua casa durante o período na Espanha, jamais esquecerei o que fizeram por mim, muitíssimo obrigado por tudo.

Ao professor Paulino Martínez e a Universidad de Santiago de Compostela por terem me recebido tão bem durante o estágio no exterior.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética de Peixes (Lagenpe) da UNESP – Bauru: Diego, Fernanda, Bruna, Caio Goes, Willian, Raul, Caio Felipe, Ricardo, Andrea, Carolina, Lilian, Egberto, Cahique, Sandro, Sheila, Ana, Roger, Vinicius, Ana Carolina, além de todos que passaram durante a minha formação, por todos os momentos que passamos juntos e principalmente pela amizade que cultivamos ao longo destes anos.

Aos amigos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp – Botucatu, pela parceria e amizade.

Aos docentes e servidores do Departamento de Ciências Biológicas da Unesp de Bauru e do Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu, pela atenção.

Aos amigos Ricardo Utsunomia e Bruno Melo pela amizade e participação na banca de qualificação, além das valiosas críticas para a conclusão desta tese.

Ao amigo Luis Alberto (Gordo) pela amizade e valiosa ajuda nas idas e vindas ao CEPTA, além das coletas do rio Grande.

Ao amigo Vinícius e ao professor Rodney da Universidade do Sagrado Coração pela amizade e ajuda com as coletas no rio Batalha.

A todos os professores, pesquisadores, alunos, amigos e técnicos do grupo ACUIGEN, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha: Adrián Chiclana, Carlos Copel, Marina, Marialaura, Néstor, Andres, Ana, Jeannette, Francesco, Carlha, Belén, Carlos, Carmen, Jorge, Laura, Lucía, María Portela, María (Peque), Manuel, Mónica, Miguel, Paulino, Raquel, Sonia, Susana, Vanessa, Adrián. Obrigado a todos pelos ensinamentos e pela amizade que recebi desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório. Em especial, agradeço aos amigos Marialaura e Néstor pela amizade e por todos os momentos especiais que passamos juntos.



Ao grande amigo Juarez Cotrim pela amizade e por fazer possível a coleta no rio Apa, a qual foi fundamental para a conclusão desta tese, muito obrigado!

À minha mãe Miriam e meus avós: Valdelício e Wanda, por todo amor e incentivo, onde quer que eu estivesse e em todas decisões que tomei. Obrigado por estarem sempre presentes e fazerem parte da minha vida.

À minha irmã Manoela e minhas sobrinhas - Ananda e Alana, pelo amor e por serem tão especiais para minha vida.

Ao meu irmão Murilo (*in memoriam*), por todo amor e companheirismo em vida, por me apoiar sempre nas decisões, por ter sido uma pessoa de ótimo caráter, além de me fazer pensar todos os dias em você e assim conseguir forças para seguir adiante.

À minha sogra Terezinha e meu sogro Valdir por me acolherem na sua família e sempre me apoiar, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha noiva Amanda, por todo amor e dedicação durante todos estes anos e por ser o alicerce da minha vida, sempre me apoiando e me dando forças nestes 14 anos de convivência. Te amo muito!

## RESUMO

Os cromossomos B são cromossomos adicionais de natureza dispensável e estão amplamente distribuídos entre os genomas dos eucariotos. Sua estrutura, origem, função, manutenção e comportamento são particulares nos diferentes grupos de uma maneira espécie-específica. Dentre os peixes portadores de cromossomos B da região Neotropical podemos destacar a espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), sendo uma espécie de grande ocorrência na bacia do rio de La Plata. Citogeneticamente, essa espécie apresenta um número diploide composto por 54 cromossomos dos tipos meta/submetacêntrico e apresenta um interessante sistema de microcromossomos B, que pode ocorrer variação interindividual de zero a nove supranumerários, além de apresentar polimorfismo, sendo encontrados três variantes morfológicas (acrocêntrica, metacêntrica e submetacêntrica). *P. lineatus* pode ser considerada uma espécie modelo de peixe Neotropical para estudos concernentes à origem, comportamento e evolução dos cromossomos B, devido à facilidade de captura, manejo, elevada frequência de supranumerários, além de ter sido utilizada em vários estudos pioneiros relacionados a estrutura, herança e origem dos Bs nos peixes. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a ocorrência dos cromossomos B em *P. lineatus* ao longo da bacia do rio de La Plata, onde esta espécie está amplamente distribuída, pois a maioria dos estudos foram conduzidos na população do rio Mogi Guaçu. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo estudar a ocorrência dos supranumerários nos peixes do Neotrópico, além de efetuar um estudo sobre a distribuição dos Bs na espécie *P. lineatus* ao longo da bacia do rio Paraná. A revisão dos cromossomos B nos peixes neotropicais mostrou que atualmente são descritos em 73 espécies de peixes, distribuídas em 20 famílias de 6 diferentes ordens. A ordem dos Characiformes representa o maior número de espécies portadoras de cromossomos B, com quase 50% do total de descritos. Além disso, a análise citogenética em *P. lineatus* de diversas localidades

evidenciou uma macroestrutura cariotípica conservada dos cromossomos A. No entanto, ao observar a ocorrência dos Bs nas diferentes populações foi possível levantar hipóteses sobre a origem destes elementos genômicos na bacia do alto rio Paraná, mais especificamente na bacia do rio Grande. Adicionalmente aos dados citogenéticos foram utilizados marcadores moleculares nucleares (microssatélites) e mitocondriais (sequenciamento da região controle) para averiguar se há estruturação populacional nesta espécie. Os dados observados a partir de marcadores moleculares indicaram ausência de estruturação populacional sugerindo uma panmixia para populações de *P. lineatus*. Entretanto, ao observar os resultados utilizando os Bs como marcadores populacionais foi observada uma acentuada diferenciação populacional, o que sugere que a ocorrência dos Bs é relativamente recente nesta espécie e que a evolução destes elementos se dá de maneira muito mais rápida que os marcadores moleculares utilizados no presente estudo. Por fim, podemos pensar na possibilidade da utilização dos cromossomos B como uma importante ferramenta no estudo populacional em espécies migradoras que apresentam uma dificuldade na detecção de diferenciação populacional, assim como ocorre em *P. lineatus*.

## ABSTRACT

B chromosomes are additional chromosomes of a dispensable nature and are widely distributed among eukaryotic genomes. Their structure, origin, function, maintenance and behavior are particular in the different groups in a species-specific manner. Among the fish with B chromosomes of Neotropical region we can highlight a species *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), being a species of great occurrence in the La Plata River basin. Cytogenetically, this species presents a diploid number of 54 chromosomes of the meta/submetacentric types and presents an interesting system of microchromosomes B, which can occur interindividual variation from zero up to nine supernumeraries, besides presenting polymorphism, being found three morphological variants (acrocentric, metacentric and submetacentric). *P. lineatus* can be considered a model species of Neotropical fish for studies concerning the origin, behavior and evolution of B chromosomes, due to the ease of capture, handling, high frequency of supernumerary, and has been used in several pioneering studies related to the structure, inheritance and origin of Bs in fish. However, little is known about the occurrence of B chromosomes in *P. lineatus* along the La Plata basin, where this species is widely distributed, since most of the studies were conducted in the Mogi Guaçu River population. Therefore, the present study had as objective to study the occurrence of supernumerary in neotropical fish, besides carrying out a study on the distribution of Bs in *P. lineatus* along the Paraná River basin. The review of B chromosomes in neotropical fish showed that they are currently described in 73 species of fish distributed in 20 families from 6 different orders. The order of Characiformes represents the largest number of species bearing B chromosomes, with almost 50% of the total described. In addition, cytogenetic analysis in *P. lineatus* from several localities showed a conserved karyotype macrostructure of A chromosomes. However, when observing the occurrence of Bs in the different populations, it

was possible to hypothesize about the origin of these genomic elements in the upper Paraná River basin, more specifically in the Grande River basin. In addition to the cytogenetic data, nuclear (microsatellite) and mitochondrial molecular markers (control region sequencing) were used to determine if there is a population structure in this species. The molecular data indicated absence of population structure suggesting a panmixia for *P. lineatus*. However, observing the results using the Bs as population markers showed a population differentiation, which suggests that the occurrence of Bs is relatively recent in this species and the evolution of these elements occurs much faster than the molecular markers used in the present study. Finally, we can think about the possibility of using the B chromosomes as an important tool in population studies in migratory species which present a difficulty in the detection of population differentiation, as in *P. lineatus*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 A ictiofauna Neotropical.....	1
1.2 Características gerais dos Characiformes com ênfase no gênero <i>Prochilodus</i> .....	3
1.3 Estudos citogenéticos no gênero <i>Prochilodus</i> .....	6
1.4 Os cromossomos B .....	8
1.4.1 Aspectos gerais.....	8
1.4.2 Novas perspectivas sobre o estudo dos cromossomos B.....	10
1.4.3 Hipóteses sobre a origem dos cromossomos B .....	11
1.4.4 Manutenção dos cromossomos B.....	13
1.4.5 Herança dos cromossomos B .....	15
1.4.6 Cromossomos B em peixes neotropicais.....	16
1.4.7 Cromossomos B em <i>Prochilodus lineatus</i> .....	18
1.5 Estudos populacionais em peixes neotropicais, com ênfase em marcadores de DNA mitocondrial .....	20
1.6 O uso de marcadores microssatélites .....	22
1.7 Estudos populacionais em <i>Prochilodus lineatus</i> .....	23
1.8 Justificativa .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 Material.....	27
3.2 Locais de coleta .....	27
3.3 Captura dos exemplares .....	30
3.4 Métodos .....	31
3.4.1 Marcação dos exemplares .....	31
3.4.2 Análises citogenéticas .....	33
3.5 Utilização de marcadores citogenéticos.....	38
3.5.1 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NOR) através da impregnação com nitrato de prata (Ag-NO <sub>3</sub> ).....	38
3.5.2 Caracterização da heterocromatina constitutiva.....	39
3.6 Utilização de marcadores moleculares .....	40
3.6.1 Extração de DNA e quantificação das amostras .....	40
3.6.2 Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de nadadeira.....	40

3.6.3 Seleção dos <i>loci</i> microssatélites .....	41
3.6.4 Análises populacionais utilizando microssatélites .....	43
3.6.5 Amplificação da região controle (mtDNA).....	44
3.6.6 Purificação do produto de PCR (mtDNA região controle) .....	45
3.6.7 Reação de sequenciamento (mtDNA região controle).....	45
3.6.8 Purificação das amostras amplificadas.....	46
3.6.9 Análise populacional utilizando a região controle .....	47
3.6.10 Análise populacional utilizando os cromossomos B como marcadores .....	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
CAPÍTULO 1.....	50
CAPÍTULO 2.....	68
CAPÍTULO 3.....	82
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>112</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>
<b>7 APÊNDICES .....</b>	<b>142</b>
7.1 Apêndice 1 .....	142

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 A ictiofauna Neotropical**

Há aproximadamente 35.700 espécies de peixes descritas, incluindo os fósseis (Zhang, 2013), desta forma, é considerado o grupo mais diversificado que habita os ambientes aquáticos (Nelson, 2006). Dentre todas as espécies de peixes descritas, pelo menos 13.000 são exclusivas de ambientes de águas continentais (Agostinho et al., 2008). No entanto, a extensa rede hidrográfica e os problemas de acesso aos locais de amostragem dificultam o conhecimento da real diversidade dos peixes dulcícolas (Vari e Malabarba, 1998).

A região Neotropical compreende a área desde parte do México, Caribe, até o sul da América do Sul e contém a fauna de peixes mais rica do mundo (Reis et al., 2016). A maior parte desta diversificação teve início no Cretáceo, num período entre 120 a 100 Ma, durante o processo de separação dos continentes Africano e Sul Americano (Brito et al., 2007; Albert et al., 2011). A estimativa para o total de espécies de peixes para o Neotrópico é de 9.100 espécies (Reis et al., 2016).

De acordo com Reis et al., (2016), as espécies de peixes dulcícolas de águas neotropicais existentes correspondem a aproximadamente 27% de todas as espécies de peixes do mundo, entretanto, este número torna-se impressionante, já que toda esta diversidade ocorre em ambientes de águas continentais, os quais representam apenas 0,03% de toda a água do planeta (Vari e Malabarba, 1998). Contudo, o conhecimento da biologia básica de suas espécies ainda é um dos maiores desafios da ictiologia, sendo as espécies de pequeno porte as menos conhecidas, desde o ponto de vista taxonômico até a quantificação de aspectos da ecologia populacional, reprodutiva o que dificulta a adoção de medidas mais eficientes de manejo e conservação (Sanna-Kaisa e Jukka, 2004; Martins-Queiroz et al., 2008).



A ictiofauna Neotropical no Brasil se apresenta como um notável recurso natural, onde são conhecidas cerca de 2.481 espécies de peixes (Buckup et al., 2007). Diante disto, pode-se considerar que o Brasil comporta a maior diversidade de peixes neotropicais do mundo. Entretanto, ainda são escassas as informações disponíveis sobre a ictiofauna marinha no Brasil, com apenas 1.298 espécies de peixes descritas, incluindo quatro Myxini, 139 Chondrichthyes (tubarões e raias) e 1.155 Actinopterygii (Menezes et al., 2003), além disso, a maioria destas espécies estão presentes nas regiões caribenhas.

Dentro da região Neotropical podemos destacar a bacia do rio La Plata, a qual está situada na região sudeste da América do Sul, sendo considerada um dos maiores sistemas fluviais do planeta, cujas origens geológicas datam desde a ruptura Gondwanica durante a era mesozoica (Potter, 1997; Ribeiro, 2006; Brea e Zucol, 2011). Os principais tributários que formam esta bacia são os rios Paraná, Paraguai e Uruguai. O rio Paraná possui cerca de 1.400.000 km<sup>2</sup>, representando aproximadamente 48.7% de toda a sua área de extensão (Brea e Zucol, 2011). A área de drenagem do rio Paraná abrange uma área de aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup>, localizada região sul do escudo brasileiro, abrigando cerca de 250 espécies autóctones de peixes, sendo que 125 dessas espécies são consideradas endêmicas (Langeani et al., 2007; Albert et al., 2011). Essa riqueza de espécies corresponde a aproximadamente 6% da biodiversidade conhecida de peixes do Neotrópico (Albert et al., 2011).

A bacia do alto rio Paraná apresenta uma ictiofauna diversificada, onde são registradas aproximadamente 360 espécies (Carvalho e Langeani, 2013). Uma das causas do endemismo de peixes na bacia do alto rio Paraná se deve à barreira biogeográfica do salto de Sete Quedas, antes de ser inundada para o fechamento da barragem de Itaipu em 1982, a qual isolava assembleias de peixes da porção abaixo e acima do rio Paraná (Agostinho et al., 2004).

## 1.2 Características gerais dos Characiformes com ênfase no gênero *Prochilodus*

A ordem Characiformes é um dos maiores grupos de peixes dulcícolas, com pelo menos 3.516 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2017). Membros dos Characiformes ocorrem na África subsaariana, sul da América do Norte, Américas Central e do Sul (Moreira, 2007). Atingem sua maior diversidade na região Neotropical representando aproximadamente 43% das espécies de peixes de águas continentais na Amazônia e cerca de 30% das espécies de peixes neotropicais (Otero e Gayet, 2001).

Há uma grande variação em tamanhos dentre os Characiformes, contendo desde espécies muito pequenas (como ocorre nos gêneros *Lepidarchus* e *Xenurobrycon*), até outras com dois metros de comprimento (*Hydrocynus goliath*). Representantes dos Characiformes ocorrem desde ambientes lênticos até lóticos. Vários grupos de Characiformes são importantes para a pesca esportiva, principalmente os peixes do gênero *Brycon* e *Salminus*, além da pesca de subsistência, sendo muitas vezes a única fonte de proteína animal de algumas populações ribeirinhas. Além disso, algumas espécies são importantes para o mercado de peixes ornamentais (por exemplo os peixes dos gêneros *Hyphessobrycon*, *Paracheirodon*, *Phenacogrammus* e *Gymnocorymbus*).

Dentre os Characiformes existem espécies que se destacam por apresentarem comportamentos migratórios, dentre elas podemos destacar o dourado (*Salminus brasiliensis*) e o curimatá (*Prochilodus* sp.) (Godinho e Kynard, 2008). A migração é um fenômeno anual em que peixes se deslocam em direção à cabeceira dos rios à procura de locais propícios para a desova e crescimento dos juvenis. Há diferentes estratégias migratórias, desde as longas migrações de espécies anádromas, como ocorre nos salmonídeos que migram do mar para as nascentes dos rios e chegam a nadar mais de mil quilômetros até as áreas de desova. Além disso, há também os chamados peixes potamódromos, que vivem exclusivamente em rios e

migram rumo às nascentes para desencadear os processos biológicos que levam à reprodução (Hilsdorf e Moreira, 2008).

Os peixes de piracema, como são conhecidos no Brasil, são os que realizam migrações reprodutivas e apresentam padrões de deslocamento de alta complexidade (Godinho e Pompeu, 2003). Todavia, ainda pouco se sabe sobre o comportamento biológico reprodutivo sobre os padrões de migração e muitas questões relativas a este tema ainda estão para serem respondidas (Godinho, 2007).

Dentre os grandes migradores da região Neotropical, podemos destacar os peixes da família Prochilodontidae os quais são considerados um dos componentes mais importantes para o comércio e a pesca de subsistência em ambientes dulcícolas da América do Sul, com exceção do Chile, onde estas espécies não ocorrem (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983). Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (2011), peixes desta família possuem a maior produção de pescado proveniente da pesca extrativa continental, com 28.643t no ano de 2010. Desta forma, são elementos de importante participação na produção de pescado e fonte proteica de populações ribeirinhas no Brasil.

Todos os Prochilodontidae são iliófagos, possuindo assim algumas adaptações anatômicas como boca em forma de ventosa para succionar o lodo do fundo dos rios e retirar os detritos orgânicos. Apresentam alta tolerância ao ambiente em que vivem, tais como mudança de pH, estratificação de temperatura elevada e baixas concentrações de oxigênio (Mago-Leccia, 1972). Além disso, a família Prochilodontidae compreende espécies de tamanho variável, com representantes alcançando mais de 50 centímetros de comprimento (Britski et al., 1988). Em uma revisão taxonômica, Castro e Vari (2004) mostraram que a família Prochilodontidae compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies).

A sistemática da família Prochilodontidae é um tanto complexa devido à estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a distinção das diferentes espécies (Mago-Leccia, 1972). Esta homogeneidade dos caracteres taxonômicos pode ser explicada devido ao fato destas espécies estarem amplamente distribuídas ao longo das grandes bacias hidrográficas da América do Sul, talvez por sua capacidade de efetuar grandes migrações com propósito reprodutivo, dispersando, desta maneira, populações em grandes áreas (Mago-Leccia, 1972).

Castro e Vari (2004) revisaram a taxonomia da família Prochilodontidae, a qual compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (*Ichthyoelephas humeralis* e *Ichthyoelephas longirostris*), *Prochilodus* (*Prochilodus argenteus*, *Prochilodus brevis*, *Prochilodus britskii*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus harttii*, *Prochilodus lacustris*, *Prochilodus lineatus*, *Prochilodus magdalenae*, *Prochilodus mariae*, *Prochilodus nigricans*, *Prochilodus reticulatus*, *Prochilodus rubrotaeniatus* e *Prochilodus vimboides*) e *Semaprochilodus* (*Semaprochilodus brama*, *Semaprochilodus insignis*, *Semaprochilodus kneri*, *Semaprochilodus laticeps*, *Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus varii*). Recentemente, Melo et al. (2016) propuseram uma filogenia molecular da família Prochilodontidae, utilizando três *loci* de marcadores nucleares e três mitocondriais, fornecendo subsídios para afirmar que há uma monofilia na família incluindo os três gêneros.

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836), é considerado um peixe migrador por excelência e grandes cardumes realizam extensas migrações nos rios da bacia do Paraná na época da piracema. Padrões migratórios em *P. lineatus* foram descritos na maior parte da bacia do rio Paraná com base em experimentos envolvendo a marcação e recaptura, biotelemetria, uso de *tags* de registro de dados e análise de tecidos rígidos, tais como os otólitos (Bayley, 1973; Lucas et al., 2001; Godinho e Kynard, 2006; Peixer e Petrere Júnior, 2009). Uma revisão dos dados de marcação e recaptura nesta espécie (Sverlij et al., 1993)

sugere que possam ocorrer extensas migrações reprodutivas, sendo documentado exemplares recapturados em 1.000 km de distância da localidade de marcação. Rotas migratórias mais curtas parecem ser mais prováveis, como indicado pela maioria das recapturas estarem contidas entre 50 e 500 km de distância a partir do local de marcação (Espinach Ros et al., 1990).

### 1.3 Estudos citogenéticos no gênero *Prochilodus*

Estudos em ictiologia revelam um interesse crescente pela citogenética de peixes, devido à problemática taxonômica e filogenética que tem motivado grande parte das pesquisas da área neste grupo. No último levantamento realizado foram reportadas informações citogenéticas disponíveis para cerca de 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199 espécies não pertencentes à superordem Ostariophysi e 109 espécies de peixes marinhos (Oliveira et al., 2007). Em outra revisão, Oliveira et al. (2009) incluíram a descrição 62 espécies contendo cromossomos sexuais em seu conjunto cariotípico.

Os primeiros estudos realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990) sobre a citogenética de peixes do gênero *Prochilodus* sugeriram a existência de uma homogeneidade dos caracteres cariotípicos básicos. Vários estudos mostraram que exemplares de *Prochilodus* analisados citogeneticamente continham um número diploide de 54 cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009; Voltolin et al., 2013a). Voltolin et al. (2013a) realizaram um estudo citogenético comparativo envolvendo cinco espécies de *Prochilodus* (*P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans*) que apresentaram uma composição cariotípica conservada, havendo apenas poucas variações no padrão de heterocromatina constitutiva.

Diante disso, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada.

Análises do bandamento C realizadas em preparações cromossômicas de indivíduos destas espécies evidenciaram a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas dos cromossomos, com a presença de alguns blocos heterocromáticos (Voltolin et al., 2013a). Além disso, os cromossomos B dos indivíduos portadores apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Pauls e Bertollo, 1990; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003), embora já tenha sido descrito a presença de blocos eucromáticos nos cromossomos supranumerários de exemplares de *P. lineatus* na bacia do rio Tibagi, Paraná (Artoni et al., 2006).

Alguns trabalhos descritos na literatura para o gênero *Prochilodus* relatam que a técnica de detecção da Região Organizadora de Nucléolo (NOR) por meio da impregnação por nitrato de prata, evidenciaram as NORs na região intersticial do braço longo de um par cromossômico metacêntrico de tamanho médio (Pauls e Bertollo, 1990; Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Vicari et al., 2006, Voltolin et al., 2013a). A região de NOR simples localizada intersticialmente é uma condição bastante comum encontrada nesse grupo como nas espécies *P. brevis*, *P. argenteus*, *P. nigricans*, *P. costatus* (Pauls e Bertollo, 1990) e *P. mariae* (Oliveira et al., 2003). A localização dos genes ribossomais rDNA 5S e 18S indicaram sintonia em *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans* (Voltolin et al., 2013a). A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação rara entre os vertebrados. Além da descrição em algumas espécies do gênero *Prochilodus*, esta sintonia também foi observada nos peixes *Salmo salar* (Pendás et al., 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Morán et al., 1996), *Astyanax* (Almeida-Toledo et al., 2002), *Triporthus nematurus* (Diniz et al., 2009), *Pimelodus britskii* (Moraes Neto et al., 2011). Por outro lado, em várias espécies de peixes, estes *loci* tem sido mapeados em distintos

cromossomos (Martínez et al., 1996; Morán et al., 1996; Born e Bertollo, 2000; Ferro et al., 2001; Vicente et al., 2001; Wasko et al., 2001; Noieto et al., 2007), representando a condição mais frequente descrita para vertebrados (Lucchini et al., 1993; Drouin e Muniz de Sá, 1995; Suzuki et al., 1996).

Adicionalmente, uma interessante característica citogenética de várias espécies do gênero *Prochilodus* é a abundante presença de cromossomos B, que foram primeiramente descritos em *P. lineatus* por Pauls e Bertollo (1983).

## **1.4 Os cromossomos B**

### **1.4.1 Aspectos gerais**

Os cromossomos B foram descobertos nos primórdios da história da citogenética clássica quando Wilson (1907) observou a presença de cromossomos “extras” em hemípteros *Metapodius*. Alguns anos depois, casos similares foram descobertos em besouros *Diabrotica* (Stevens, 1908) e no milho (Kuwada, 1915). Diferentes nomenclaturas foram adotadas para descrever os cromossomos supranumerários, incluindo “fragmentos cromossômicos extras” (Müntzing, 1944; Östergren, 1945), “cromossomos supérfluos” (Hakansson, 1945) e “cromossomos acessórios” (Hakansson, 1948; Müntzing, 1948).

Os cromossomos B, também conhecidos como Bs ou cromossomos supranumerários, são elementos extras presentes no genoma de várias espécies dentre os eucariotos. Nas plantas há a descrição de cromossomos B em 979 espécies de angiospermas, representando 8% das monocotiledôneas e 3% das dicotiledôneas (Levin et al., 2005). Dentre os animais, o grupo mais bem caracterizado são os Artrópodes, classe Insecta, com os Orthoptera representando 92 espécies, Diptera 42, e Coleoptera 40 espécies (Camacho, 2005). Nos mamíferos os Bs ocorrem em 55 espécies, sendo os roedores o grupo mais representativo (Vujosevic e

Blagojevic, 2004). Em uma recente revisão, Jones (2017) descreve a ocorrência de 1685 organismos portadores de cromossomos B nos eucariotos até o presente momento, tendo uma descrição de 406 novas ocorrências nos últimos 35 anos.

A definição mais comum dos Bs é que estes seriam cromossomos adicionais, dispensáveis para o crescimento e desenvolvimento dos organismos portadores, que apresentam frequência variável e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, porém seguindo um caminho evolutivo independente. A composição, função e especialmente a origem dos cromossomos B ainda são questões bastante controversas e não resolvidas no campo da citogenética.

Houben et al. (2014) definem cromossomos B como elementos adicionais ao conjunto de cromossomos normais. Estes elementos adicionais apresentam herança não-mendeliana e têm sido amplamente descritos em milhares de animais, plantas, fungos e outras espécies, mas ainda permanecem como um mistério evolutivo. São encontrados em alguns indivíduos de uma determinada população, e podem variar em número inter e intraindividualmente. Além disso, diferentes tipos de cromossomos B podem existir dentro da mesma espécie.

Inicialmente, e até há pouco tempo, os cromossomos B foram considerados como elementos não-funcionais e sem deter quaisquer genes essenciais, uma vez que são dispensáveis para o crescimento normal do organismo portador, não conferindo qualquer vantagem adaptativa (Houben et al., 2014). Muitos autores consideram estes cromossomos como elementos parasitas (ou egoístas) presente nos genomas de muitas espécies e persistem nas populações fazendo uso da maquinaria celular necessária para sua transmissão com um mecanismo de acúmulo próprio (Cabrero et al., 2013). Quando presentes em número reduzido, os supranumerários geralmente têm pouco ou nenhum impacto sobre os portadores, no entanto, uma elevada frequência dos Bs pode causar diferenças fenotípicas e reduzir a fertilidade em alguns casos (Camacho et al., 2000; Jones e Houben, 2003; Camacho, 2005).



Por fim, os supranumerários têm despertado grande interesse na comunidade científica devido apresentarem, aparentemente, material genético dispensável e ainda persistirem em populações sem serem eliminados pela seleção natural. Apesar da ampla distribuição taxonômica dos cromossomos B, o conhecimento da origem, composição, regulação e mecanismos de acúmulo destes cromossomos foram limitados até muito recentemente. Devido aos avanços das tecnologias de sequenciamento e ferramentas de bioinformática o conhecimento biológico dos cromossomos B têm melhorado significativamente nos últimos anos.

#### **1.4.2 Novas perspectivas sobre o estudo dos cromossomos B**

Os cromossomos B estão ranqueados como um dos principais temas de pesquisa de citogenética e biologia cromossômica nos últimos anos. A importância dos Bs tem sido amplamente discutida nas últimas décadas através de uma série de conferências organizadas para discutir o tema (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> B Chromosome Conferences, realizadas em 1993, 2004 e 2014, respectivamente). Os estudos envolvendo supranumerários avançaram desde a citogenética clássica (conduzida durante a maior parte do século 20) e citogenética molecular (desde os anos 90 até hoje) para análise genômica e ferramentas de bioinformática, sendo conduzida nos últimos anos com o advento de novas metodologias de sequenciamento de nova geração (SNG) com um custo mais baixo (Valente et al., 2017).

Estudos em citogenética clássica e molecular foram extensivamente utilizados para o entendimento dos Bs, numa tentativa de responder questões acerca de sua origem e evolução. Embora estas metodologias tenham provido descobertas importantes, elas apresentam um limite de resolução a nível molecular (Valente et al., 2017). Todavia, os avanços tecnológicos de sequenciamento permitiram uma investigação massiva sobre questões estruturais e

funcionais relacionadas aos cromossomos B que anteriormente e até pouco tempo não seria possível (Valente et al., 2017).

Martis et al. (2012) utilizaram SNG a partir de Bs isolados de centeio e descobriram que estes cromossomos são basicamente derivados dos autossomos 3R e 7R, com subsequente acumulação de sequências de outros autossomos e genomas de organelas. A análise de genoma massiva realizada no peixe *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al., 2014) utilizando SNG de cromossomos B microdissectados e genoma total de indivíduos B+ (portador) e B- (não portador) mostraram que os Bs contêm milhares de sequências duplicadas de todos os cromossomos A desta espécie. Além disso, estes autores encontraram muitos genes nos cromossomos B, sendo que alguns deles ainda permaneciam intactos.

Por fim, pode-se afirmar que as informações dos estudos recentes envolvendo SNG mudaram a visão clássica de que os cromossomos B são pobres em genes/atividade gênica, sugerindo que os Bs podem exercer um papel importante sobre a biologia celular (Valente et al., 2017).

### **1.4.3 Hipóteses sobre a origem dos cromossomos B**

Até o momento, não existe uma elucidação definitiva sobre a origem dos cromossomos B. No entanto, há muitas hipóteses que tentam explicar os diversos caminhos evolutivos que originaram os supranumerários (Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Berdnikov et al., 2003; Jones e Houben, 2003). As características dos cromossomos B variam de uma maneira espécie-específica, portanto, sabemos hoje que os cromossomos B apresentam origens distintas nos diferentes organismos portadores.

Diferentes alternativas têm sido consideradas quanto à origem dos cromossomos B as quais, entretanto, podem ser enquadradas entre duas possibilidades gerais, ou seja, a origem intra ou interespecífica. No primeiro caso, os cromossomos B se originaram do complemento

padrão (também chamados de cromossomos A), porém seguindo um caminho evolutivo independente (Camacho et al., 2000; Teruel et al., 2009). No mosquito *Chironomus plumosus*, por exemplo, os padrões de bandamentos nos cromossomos B são similares aos encontrados na região próxima ao centrômero do quarto par autossômico, evidenciando uma possível origem intraespecífica dos Bs nesta espécie (Keyl e Hägele, 1971).

A origem intraespecífica teve suporte com alguns estudos de cromossomos B em peixes (Mestriner et al., 2000; Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006). Como é o caso do peixe *Astyanax scabripinnis*, onde sequências do DNA satélite As51 encontram-se presentes simetricamente em ambos os braços de um grande cromossomo B metacêntrico, assim como em um cromossomo acrocêntrico (par 24) do complemento padrão, sugerindo uma possível origem intraespecífica dos Bs nesta espécie a partir da formação de um isocromossomo (Mestriner et al., 2000).

No segundo caso, os supranumerários podem surgir a partir de um evento de hibridização, em decorrência de acasalamentos de espécies proximamente relacionadas (Schartl et al., 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001). A origem dos Bs a partir de uma hibridização bem-sucedida foi descrita por Perfectti e Werren (2001) ao observarem a presença de cromossomos supranumerários em uma linhagem de vespas do gênero *Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre duas espécies diferentes, *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

Os cromossomos sexuais também têm sido previamente propostos como ancestrais dos cromossomos B (Yoshida et al., 2011). Entretanto, diferentes hipóteses sobre a origem dos cromossomos B têm surgido, em decorrência do conhecimento da estrutura molecular dos fragmentos livres de DNA de origem não cromossômica, comumente encontrados nos núcleos das células. A hipótese de que os segmentos genômicos supranumerários tenham surgido a partir destes fragmentos, num modelo de desenvolvimento independente também deve ser

considerada (Foresti, 1998). Diante disso, pode-se afirmar que os cromossomos supranumerários parecem não apresentar um modelo de origem único, mas ao contrário, podem ter se originado de modo independente por vários caminhos evolutivos de uma maneira espécie-específica (Jesus et al., 2003).

#### 1.4.4 Manutenção dos cromossomos B

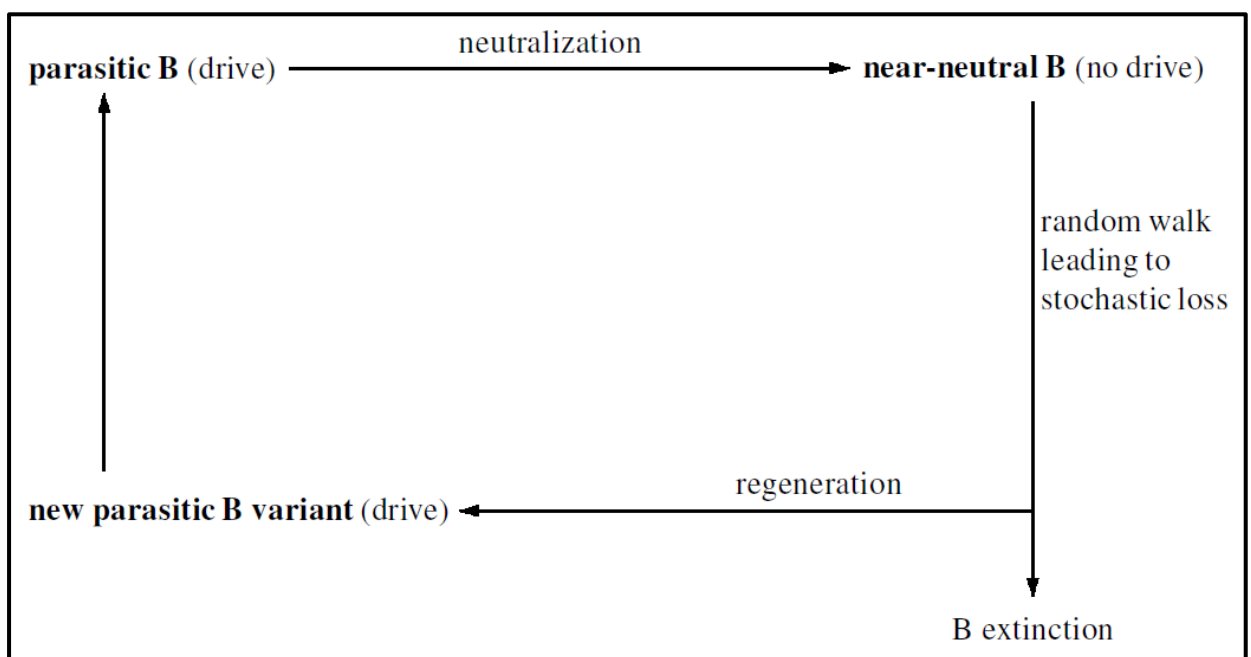
Dois modelos são propostos para explicar a manutenção dos B em populações naturais: o modelo heterótico e o modelo parasítico. De acordo com o modelo heterótico proposto inicialmente por White (1973), os cromossomos B seriam mantidos graças às vantagens adaptativas que conferem aos seus portadores quando se encontram em números baixos para que não haja um gasto energético excessivo para a sua manutenção nas células. Já o modelo parasítico proposto foi discutido por vários autores (Östergren, 1945; Nur, 1966 a, b; Nur, 1977; Jones, 1985; Shaw e Hewitt, 1990), onde consideram que os Bs permanecem nas populações em razão de seus próprios meios de acúmulo, utilizando a maquinaria celular para se multiplicar e ser transmitido para as futuras gerações. Nesta segunda hipótese, esses cromossomos se apresentariam como elementos parasitas, uma vez que sua presença não traria vantagem aos seus portadores.

Quando as taxas de transmissão dos cromossomos são superiores a 0,5 ( $k_B > 0,5$ ), não obedecendo a lei Mendeliana da segregação, o resultado do acúmulo da transmissão é coletivamente referido como “*drive*” (Houben, 2017). Embora os cromossomos B apresentem a forma mais comum de *drive* conhecida para elementos genômicos (Jones, 1991), ainda pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvendo o *drive*.

A dinâmica evolutiva dos cromossomos B parasitas parece ser caracterizada por rápidas invasões em virtude do *drive*, seguida pela neutralização por meio da evolução de genes supressores presentes nos cromossomos A, os quais eliminam os efeitos do *drive* nos

Bs (Camacho et al., 1997). No modelo proposto por estes autores, o acúmulo de cromossomos B pode proporcionar um marcante aumento da frequência, em uma determinada população, em apenas dez gerações.

O comportamento meiótico irregular, como a não-disjunção, pode auxiliar na fixação e transmissão dos cromossomos B nas populações (Houben, 2017). Entretanto, se o padrão de transmissão estiver abaixo da expectativa mendeliana, os Bs estão destinados à extinção por meio de forças ao acaso (Camacho et al., 2000). Segundo Zurita et al. (1998) e Camacho et al. (2000), o ciclo de vida dos cromossomos B nas populações portadoras compreende em três fases: invasão, neutralização e extinção (Figura 1). Na fase neutra os supranumerários devem sofrer mutações em suas sequências de DNA para dar origem a uma nova variante de B e assim reiniciar seu ciclo, caso contrário estarão destinados à extinção em um longo período de tempo. No entanto, por se tratar de elementos genômicos dispensáveis eles tendem a sofrer uma taxa e mutação mais elevada, sendo mais propensos a dar origem a novas variantes de B, reiniciando assim o ciclo através do *drive*, ocasionando em um polimorfismo de cromossomos B comumente encontrado em diversas espécies portadoras.



**Figura 1.** Ciclo dos cromossomos B parasíticos, proposto por Camacho et al. (2000).

O surgimento de novas variantes de cromossomos B foi registrado na espécie de gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, onde os cromossomos B são considerados bastante mutáveis (Camacho et al., 1997; Cabrero et al. 2013). Diferentes tipos de supranumerários foram descritos decorrentes de translocação entre os cromossomos A e B (Henriques-Gil et al., 1984; Henriques-Gil e Arana, 1990). A frequente geração de novas variantes de Bs indica que o polimorfismo destes elementos genômicos é uma característica comum nas populações portadoras (López-León et al., 1994). Além disso, cada variante de cromossomo B apresenta um *drive* distinto, aumentando assim a média de Bs por indivíduo ao longo do tempo (Camacho et al., 1997).

#### 1.4.5 Herança dos cromossomos B

O controle genético e padrão de transmissão dos cromossomos B têm sido demonstrados em algumas espécies de animais como no gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw e Hewitt, 1985; Shaw et al., 1985), no bicho da farinha *Pseudococus affinis*, (Nur e Brett, 1987, 1988), no gafanhoto *Eypreponemis plorans* (Herrera et al., 1996), em algumas plantas como *Hypochoeris maculata* (Parker et al., 1982), *Aegilops speltoides* (Cebriá et al., 1994) e em *Allium schoenoprasum* (Bougourd e Plowman, 1996).

Entretanto, estudos concernentes à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes portadores são ainda bastante escassos. Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração da herança paternal ginogenética na espécie *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995). Posteriormente, Oliveira et al. (1997), Voltolin et al. (2010c) realizaram estudos sobre o mecanismo de herança dos cromossomos B em *P. lineatus* e verificaram que o padrão de transmissão destes cromossomos foi consistente com a expectativa do comportamento regular meiótico dos cromossomos B em ambos os sexos, demonstrando uma taxa de transmissão mendeliana (0,5). Entretanto, Penitente et al. (2013, 2016a) observaram

um *drive* diferente para cada variante de cromossomo B encontrado em *P. lineatus*, sendo o tipo metacêntrico com uma taxa de transmissão neutra ( $k_B = 0,5$ ), enquanto que os tipos acrocêntrico e submetacêntrico apresentaram um valor de transmissão abaixo do Mendeliano ( $k_B < 0,5$ ), indicando uma possível extinção destas variantes da população natural do rio Mogi Guaçu ao longo do tempo.

Araújo et al. (2002) ao estudarem a transmissão dos tipos de cromossomos B presentes em populações da vespa *Trypoxylon albitarse*, relataram que o tipo B metacêntrico apresentou maior taxa de transmissão comparado com o tipo B acrocêntrico. Estes autores concluíram que o tipo B metacêntrico deve apresentar, aparentemente, uma maior eficiência de transmissão em relação a variante acrocêntrica.

Estudos envolvendo o processo de herança quanto à frequência dos supranumerários têm sido realizados em diversos organismos, no entanto, ainda pouco se sabe sobre a herança, segregação meiótica e conhecimento básico sobre os mecanismos que influenciam o *drive* dos diferentes tipos de cromossomos B nas espécies portadoras, principalmente em peixes.

#### **1.4.6 Cromossomos B em peixes neotropicais**

Uma das primeiras descrições de supranumerários com características pertinentes aos cromossomos B em peixes da região Neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus* por Pauls e Bertollo (1983). Desde então, nas últimas décadas a descrição da ocorrência de Bs em espécies de peixes do Neotrópico têm crescido muito com a expansão e surgimento de novos grupos de estudos citogenéticos da ictiofauna Neotropical.

Dentre os cromossomos B descrito em peixes podemos destacar variações tanto na frequência quanto a morfologia, as quais se diferem geralmente de uma maneira espécie-específica. Há a descrição de Bs em espécies do gênero *Astyanax* de tamanho macro, médio e

micro, além disso, variam também morfológicamente, podendo se apresentar como metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntrico (Daniel et al., 2013). Entretanto, o cromossomo do tipo metacêntrico parece ser o mais comumente encontrado nas espécies de peixes.

Com relação ao tamanho, os cromossomos supranumerários encontrados em peixes exibem uma grande diversidade, ou seja, há a ocorrência de macrocromossomos descrito em algumas espécies do gênero *Astyanax* (Maistro et al., 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Ferro et al., 2003; Hashimoto et al., 2008); cromossomos supranumerários de tamanho médio, como ocorre em *Rhamdia* (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio et al., 2000) ou microcromossomos, como os encontrados em *Prochilodus* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2013a; Penitente et al., 2016ab).

Os cromossomos B também podem variar tanto inter quanto intraindividualmente nas espécies de peixes portadoras. A frequência de Bs em *Moenkhausia sanctaefilomenae* pode variar de zero a oito microcromossomos B em um único indivíduo (Foresti et al., 1989; Hashimoto et al., 2012). Oliveira e Foresti (1993) também descreveram a ocorrência de até dois microcromossomos B metacêntricos em *Steindachnerina insculpta*. Erdtmann et al., (1990) descreveram a ocorrência de até dezesseis microcromossomos B em *Callichthys callichthys*. No entanto, em espécies do gênero *Astyanax*, o padrão mais comumente encontrado é a ocorrência de apenas um supranumerário (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Néó et al., 2000; Moreira-Filho et al., 2001, Hashimoto et al., 2008; Daniel et al. 2013).

Por fim, a estimativa da ocorrência de cromossomos B em peixes neotropicais pode ser muito maior, pois ainda há uma carência em estudos filogenéticos e citogenéticos básicos que permitam identificar espécies novas, o que dificulta a descrição de supranumerários em novas espécies.



#### 1.4.7 Cromossomos B em *Prochilodus lineatus*

Desde a primeira descrição de Bs em *P. lineatus*, a mais de três décadas, vários estudos foram realizados nesta espécie, resultando em conclusões relevantes para o tema dos cromossomos B nos peixes (Pauls e Bertollo, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus et al., 2003; Voltolin et al., 2010abc, 2011, 2013ab; Penitente et al., 2013, 2016ab). Diante disto, podemos afirmar que *P. lineatus* pode ser considerada, juntamente com os peixes do gênero *Astyanax*, como espécies modelo no estudo sobre a origem, função e manutenção dos Bs nos peixes neotropicais.

Em *P. lineatus*, os cromossomos B apresentam um tamanho reduzido, podendo ser classificados como microcromossomos (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Entre os exemplares capturados em diferentes localidades, foi constatada uma variação modal de cromossomos supranumerários, contudo, em todas as populações analisadas, o número desses cromossomos está contido entre os valores de zero a nove (Voltolin et al., 2011).

Em outro estudo realizado com exemplares do rio Mogi-Guaçu, foi demonstrado que o número de Bs não é estável, sendo observado um aumento da média ao longo do tempo, a partir das primeiras observações realizadas naquela localidade (Pauls e Bertollo, 1983). No entanto, vários autores (Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 1997; Voltolin et al., 2010b) detectaram uma estabilidade mitótica na frequência de cromossomos B, ou seja, não há variação intraindividual na população natural de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, sendo constatado um número modal de 2 a 3 Bs.

Microcromossomos B também foram identificados na espécie *P. brevis* (cit. *Prochilodus cearensis*) por Pauls e Bertollo (1990). Além de apresentar todas as características dos cromossomos B de *P. lineatus*, a espécie *P. brevis* apresentou uma variação de até dois Bs. Venere et al. (1999) descreveram a ocorrência de até dois Bs na espécie *P. nigricans*

coletados no rio Araguaia, os quais foram considerados totalmente heterocromáticos após o bandamento C. Estudos realizados por Oliveira et al. (2003) identificaram a presença de até três Bs na espécie *P. mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

Recentemente supranumerários foram descritos em mais duas espécies de *Prochilodus*, sendo a ocorrência de até três Bs em *P. argenteus* (Penitente et al., 2015) e um cromossomo B em *P. costatus* (Melo et al., 2017). No entanto, dentre as 13 espécies de *Prochilodus* descritas, apenas oito foram cariotipadas até agora, sendo reportada a ocorrência de cromossomos B em seis delas, portanto, a origem dos Bs dentro deste gênero pode ser em decorrência de um antigo evento filogenético neste grupo (Melo et al., 2017).

Na literatura existem muitos estudos que descrevem a variação da frequência dos Bs em *P. lineatus*, no entanto, Artoni et al. (2006) e Penitente et al. (2013, 2016a), ao estudarem exemplares desta espécie provenientes do rio Mogi Guaçu evidenciaram a presença de três variantes morfológicas básicas, podendo ser classificados como metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntricos, sendo o tipo metacêntrico o mais frequente. Além disso, estes Bs se diferem em tamanho, sendo o tipo submetacêntrico o maior, metacêntrico o de tamanho médio e o tipo acrocêntrico o menor dentre todas as variantes.

A transmissão dos tipos de Bs em *P. lineatus* foi descrita por Penitente et al. (2013, 2016a) ao estudarem o *drive* envolvendo cada tipo de supranumerário da população do rio Mogi Guaçu por meio de cruzamentos induzidos. Estes autores sugerem que a variante metacêntrica se apresenta estável na população, enquanto que os tipos acro e submeta estão sofrendo uma redução na frequência devido a uma baixa taxa de transmissão ( $k_B < 0,5$ ), o que pode levar a uma extinção dos mesmo ao longo do tempo, caso não ocorram mutações que propiciem uma regeneração no ciclo.

Estudos sobre a origem dos Bs em *P. lineatus* foram primeiramente conduzidos por Jesus et al. (2003), que ao analisar a distribuição do DNA satélite SATH1 observaram

homologias entre regiões pericentroméricas dos cromossomos A com os Bs, sugerindo assim uma hipótese de origem intraespecífica dos supranumerários nesta espécie. Artoni et al. (2006) também analisaram a distribuição de SATH1 em *P. lineatus*, encontrando marcações simétricas dos mesmos nos Bs da população do rio Tibagi, sugerindo também uma hipótese de origem intraespecífica por meio da formação de isocromossomos.

Voltolin et al. (2010a, 2013b) conduziram estudos sobre a origem dos Bs em *P. lineatus* na população do rio Mogi Guaçu utilizando a metodologia de microdissecção cromossômica aliada à técnica de DOP-PCR para a produção das sondas B-específicas. Estes autores não encontraram homologias entre os cromossomos B e A, portanto sugeriram uma hipótese sobre origem interespecífica na espécie. No entanto, Penitente et al. (2016) realizaram um estudo parecido, porém isolando sondas de cada tipo de B, também por meio de microdissecção, e constataram que apenas a variante submetacêntrica apresentava homologia com regiões centroméricas dos cromossomos A, assim como descrito previamente por Jesus et al. (2003), reforçando a hipótese de origem intraespecífica destes elementos genômicos nesta espécie.

### **1.5 Estudos populacionais em peixes neotropicais, com ênfase em marcadores de DNA mitocondrial**

A identificação e a caracterização dos padrões genético-populacionais são de fundamental importância para o planejamento adequado de programas de conservação, manejo e exploração dos bancos genéticos selvagens das espécies nativas da ictiofauna Neotropical (Toledo-Filho et al., 1999). Na piscicultura já existem vários estudos empregando diversos marcadores genéticos, pois, antes de se iniciar o cultivo de um estoque é imprescindível que se conheça a variabilidade genética da população fundadora (Toledo-Filho et al., 1992). Além disso, o uso de marcadores genéticos torna-se cada vez mais necessário

para a identificação de híbridos nos estoques de reprodutores nas pisciculturas brasileiras (Porto-Foresti et al., 2011).

Atualmente, há a descrição de diversos marcadores genéticos disponíveis para averiguar a estruturação populacional em peixes, associados tanto ao genoma nuclear como ao genoma mitocondrial. Dentre tantos, podemos destacar o DNA mitocondrial (mtDNA), pois apresenta características que o tornam um excelente marcador para estudos evolutivos, pois apresenta um genoma compacto com estrutura e organização simples, ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis, elevada taxa de substituição nucleotídica, herança predominantemente materna, conservação do conteúdo gênico e facilidade de purificação, além do fato de possuir várias cópias por célula (Avice et al., 1987).

O mtDNA constitui uma importante fonte de marcadores genéticos moleculares, pois a maior parte de sua variabilidade encontra-se distribuída inter-estoques ao invés de intra-estoques, isto parece ocorrer porque o mtDNA é mais suscetível às consequências da deriva genética do que o DNA nuclear (Avice et al., 1979ab; Brown et al., 1979). Além disso, o mtDNA apresenta uma taxa de substituição de nucleotídeos de 5 a 10 vezes superior à do DNA nuclear, sendo a região controle, também conhecida como *D-loop* (*Displacement loop*), a mais variável (Brown et al., 1979; Harrison, 1989).

Adicionalmente, informações fornecidas pela análise do mtDNA mostraram-se úteis na identificação de diferentes bancos genéticos em populações intraespecíficas na área de ictiologia (Avice, 1992; Calcagnotto, 1998). Além de acrescentar uma perspectiva filogeográfica à demografia e à estrutura populacional de uma determinada espécie, os dados obtidos também podem contribuir para um conhecimento mais aprofundado a respeito da diversidade genética em diversos organismos (Avice, 1992).

## 1.6 O uso de marcadores microsatélites

Os microsatélites, também conhecidos como STR (*Short Tandem Repeats*), são elementos repetitivos abundantes no genoma, formados por arranjos de repetições em tandem que variam de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os *locus* mais polimórficos dos genomas (Ferguson et al., 1995). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo do DNA (Studart, 2001).

Os marcadores microsatélites vêm sendo muito utilizados nas últimas décadas por apresentarem uma série de vantagens, pois são abundantes e cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de uma pequena quantidade de DNA para análise, são facilmente detectáveis via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), apresentam herança mendeliana e são expressos como alelos codominantes (Lima, 1998; Moreira, 1999).

Todavia, os microsatélites têm sido amplamente utilizados em diversos estudos na área de genética animal, tais como: estimativas de distâncias genéticas; monitoramento de endocruzamentos; testes de paternidade em diversas espécies animais; comparações de composição genética de amostras recentes e antigas e análise da diversidade genética (Melo et al., 2008). Além disso, os microsatélites também auxiliam na identificação genética de estoques, de forma a maximizar a recuperação da variabilidade genética via cruzamentos, bem como para monitorar os níveis de endocruzamentos nos plantéis de reprodutores (Melo et al., 2008).

Os estudos genético-populacionais baseados no polimorfismo dos marcadores microsatélites nos peixes dulcícolas neotropicais têm crescido a medida que novos *locus* espécie-específicos são publicados (Hiltsdorf 2013). O primeiro estudo realizado no gênero *Prochilodus* utilizando microsatélites foi o de Hatanaka et al. (2006) ao estudarem a diferenciação genética entre populações de *P. argenteus* na bacia do rio São Francisco.

## 1.7 Estudos populacionais em *Prochilodus lineatus*

Vários estudos populacionais foram conduzidos na espécie *P. lineatus* por meio de isozimas, marcadores moleculares nucleares e mitocondriais. Em um estudo pioneiro sobre a estrutura genética em populações de *P. lineatus*, Revaldaves et al. (1997) utilizaram seis *loci* polimórficos de isozimas em 160 indivíduos pertencentes aos rios Paraná, Baía e Ivinhema. Foi constatada uma única unidade reprodutiva panmítica com alto fluxo gênico entre as três subpopulações analisadas, devido aos índices de fixação e de distância genética, além de uma alta similaridade genética entre os exemplares analisados ( $F_{ST} = 0.018$ ).

Sivasundar et al. (2001) realizaram estudos filogeográficos em quatro grandes bacias sul-americanas (Orinico, Magdalena, Amazônica e Paraná) utilizando espécies do gênero *Prochilodus*. Além disso, os autores também realizaram uma análise populacional em 26 indivíduos de *P. lineatus* dentro da bacia do Paraná, utilizando-se a região controle do DNA mitocondrial. Cada indivíduo apresentou um haplótipo distinto, mas a distribuição filogeográfica dos haplótipos não seguia a distribuição esperada de acordo com o arranjo espacial das localidades originárias de cada um. Esses resultados foram apontados como evidências de amplo fluxo gênico dentro da bacia hidrográfica e a falta de estruturação genético-populacional para esta espécie na bacia do Paraná, corroborando os resultados obtidos com isozimas realizados por Revaldaves et al. (1997).

Morelli (2008), utilizou marcadores microssatélites e sequências de *D-loop* em *P. lineatus* no intuito de averiguar a ausência de estruturação genética em populações migradoras e residentes no rio Mogi-Guaçu, alto rio Paraná, amostrados sazonalmente em diferentes anos consecutivos. Os resultados obtidos evidenciaram uma baixa diferenciação genética para microssatélites e moderada para a região controle entre as populações que migram e as residentes no rio Mogi-Guaçu. Estes autores sugerem um isolamento temporal entre as populações, associado à formação de cardumes migradores aleatórios com inserção de novos

indivíduos juvenis, alterando assim as frequências dos alelos nas populações. Outro exemplo de variação sazonal dos estoques genéticos nesta espécie também foi reportado por Rueda et al. (2013), ao estudarem cardumes de *P. lineatus* coletados na mesma localidade no rio Uruguai.

Garcez et al. (2011) analisaram exemplares provenientes da bacia do rio Grande, envolvendo os rios Grande, Mogi-Guaçu e Pardo, utilizando técnicas de PCR-RFLP no mtDNA região controle. Estes autores não encontraram estruturação genética entre as localidades amostradas, exceto amostras do rio Pardo, as quais evidenciaram níveis significantes de divergência. Além disso, os autores sugerem que os impactos ambientais causados pelas barragens não geraram, a curto prazo, diferenças significativas entre as populações estudadas.

Recentemente outros estudos populacionais foram conduzidos em *P. lineatus*. Revaldaves et al. (2016) utilizaram marcadores mitocondriais e RAPD em populações de *P. lineatus* amostrados na bacia do rio Paraná e Paraguai. Ferreira et al. (2017) analisaram populações fragmentadas por barragens no rio Paraná utilizando marcadores microssatélites e mtDNA (*D-loop*). Ambos autores não encontraram estruturação genética entre as populações desta espécie e reforçaram a hipótese de panmixia conforme já sugerida anteriormente por outros autores (Revaldaves et al., 1996; Sivasundar et al., 2001).

## **1.8 Justificativa**

Os cromossomos B têm sido o principal tema da citogenética de peixes neotropicais, desde a sua primeira descrição nesta região há mais de três décadas. Desde então, muitos estudos envolvendo marcadores citogenéticos clássicos até a utilização de sondas B-específicas a partir da microdissecção cromossômica foram realizadas para elucidar questões envolvendo a temática dos Bs. Embora importantes conclusões tenham sido obtidas acerca

dos Bs nos peixes utilizando tais técnicas, ainda restam muitas questões a serem respondidas. Neste sentido, uma revisão sobre o panorama atual da ocorrência e distribuição dos supranumerários em peixes do Neotrópico se faz necessária.

A espécie *P. lineatus* está amplamente distribuída ao longo da bacia do Paraná e apresenta inegável importância econômica e ecológica. Além disso, esta espécie é pioneira no entendimento dos cromossomos B, sendo considerada como modelo em estudos sobre a origem, transmissão e composição destes elementos adicionais nos peixes neotropicais. Os principais pontos que tornam esta espécie interessante nos estudos dos Bs se devem a elevada ocorrência de supranumerários, ampla distribuição na bacia do rio de La Plata, facilidade de captura e manejo para a reprodução induzida. Portanto, esta espécie se tornou o principal alvo de estudos focados no entendimento da herança, manutenção e origem dos Bs nos peixes neotropicais nas últimas décadas, gerando importantes conclusões sobre o tema. Entretanto, a maior parte desses estudos estão restritos à população natural do rio Mogi Guaçu.

Portanto, uma análise pormenorizada sobre a distribuição dos cromossomos B ao longo da bacia do rio Paraná em localidades não estudadas, bem como a utilização destes elementos genômicos como possíveis marcadores populacionais em *P. lineatus*, que apresenta uma problemática no estudo de estruturação populacional devido, principalmente, ao seu comportamento migratório, podem auxiliar no entendimento da origem e manutenção dos Bs nesta espécie e, de modo mais amplo, nos peixes do Neotrópico.



## 2 OBJETIVOS

A ocorrência de cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* torna esses animais um alvo de interesse no desenvolvimento de diversos estudos citogenéticos. Diante disso, os objetivos deste trabalho visaram a realização de análises citogenéticas e populacionais envolvendo, sobretudo, a frequência e distribuição ao longo da bacia do rio Paraná para obter informações acerca da origem e manutenção destes elementos genômicos nesta espécie. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Realizar uma revisão geral sobre o panorama atual dos cromossomos B em peixes neotropicais.
- 2) Efetuar uma ampla caracterização citogenética na espécie *P. lineatus* em diferentes localidades ao longo da extensa bacia do Paraná e seus afluentes.
- 3) A partir dos dados citogenéticos obtidos, mapear a distribuição dos Bs nesta espécie a fim de estabelecer possíveis correlações entre as localidades mais propícias que deram origem a estes cromossomos adicionais.
- 4) Investigar se há estruturação genética em *P. lineatus* nas diferentes localidades amostradas, por meio da utilização de marcadores de DNA mitocondrial (sequenciamento da região controle) e nucleares (microsatélites).
- 5) Por fim, comparar os dados citogenéticos referentes à frequência dos supranumerários em *P. lineatus* com os resultados obtidos na análise populacional envolvendo os marcadores moleculares e assim averiguar possíveis hipóteses sobre a dinâmica dos cromossomos B nesta espécie.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Os peixes do gênero *Prochilodus* atingem um tamanho médio de aproximadamente 50 centímetros apresentando um corpo largo, comprido e recoberto por escamas médias ou pequenas. Possuem espinho pré-dorsal e bífido. A boca é subterminal, geralmente pequena, protrátil e provida de lábios grossos (Godoy, 1975). São considerados os mais conspícuos, abundantes e dispersos dentre os peixes neotropicais habitantes dos rios sul americanos.

A espécie em estudo, *Prochilodus lineatus* (Figura 2), encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil) (Castro e Vari, 2004). Entre as características diagnósticas de *P. lineatus* estão: nadadeira caudal sem manchas negras, presença de linha lateral completa com 44 a 50 escamas e presença de 42 a 44 vértebras (Castro e Vari, 2004).



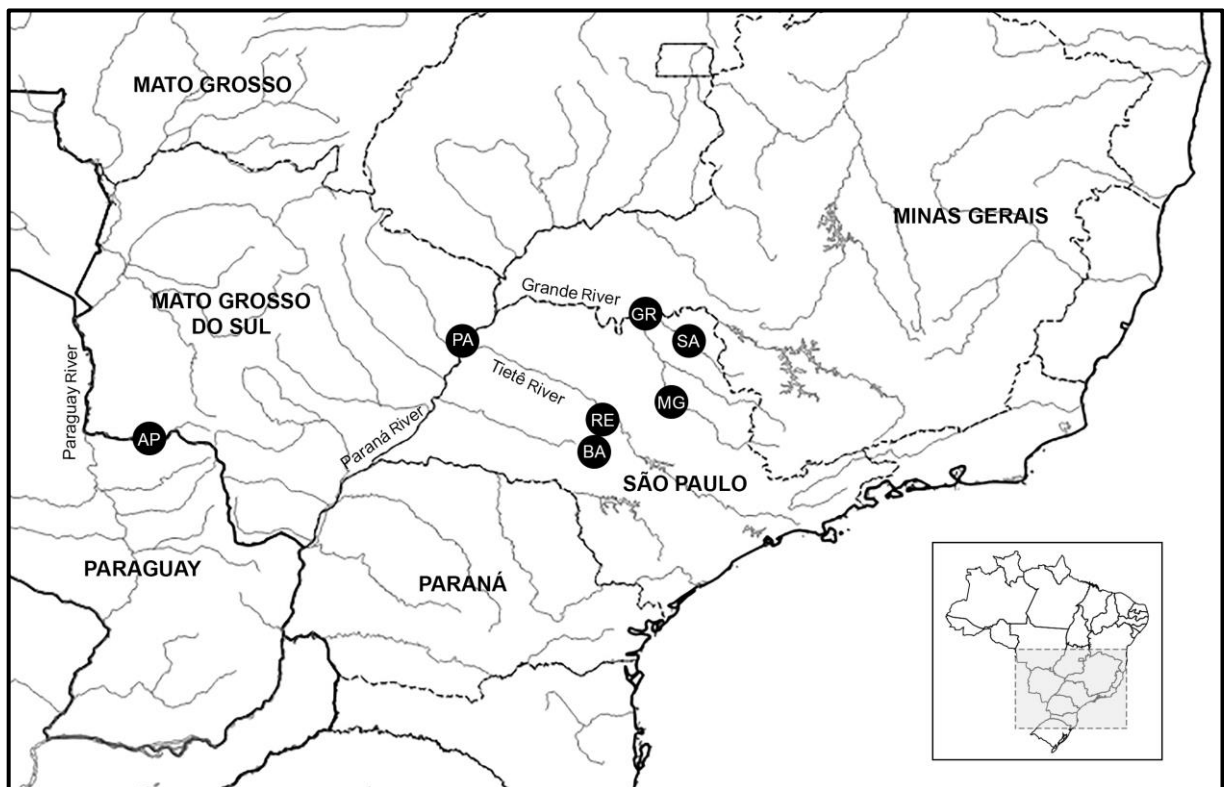
**Figura 2.** Exemplar de curimbatá (*P. lineatus*).

#### 3.2 Locais de coleta

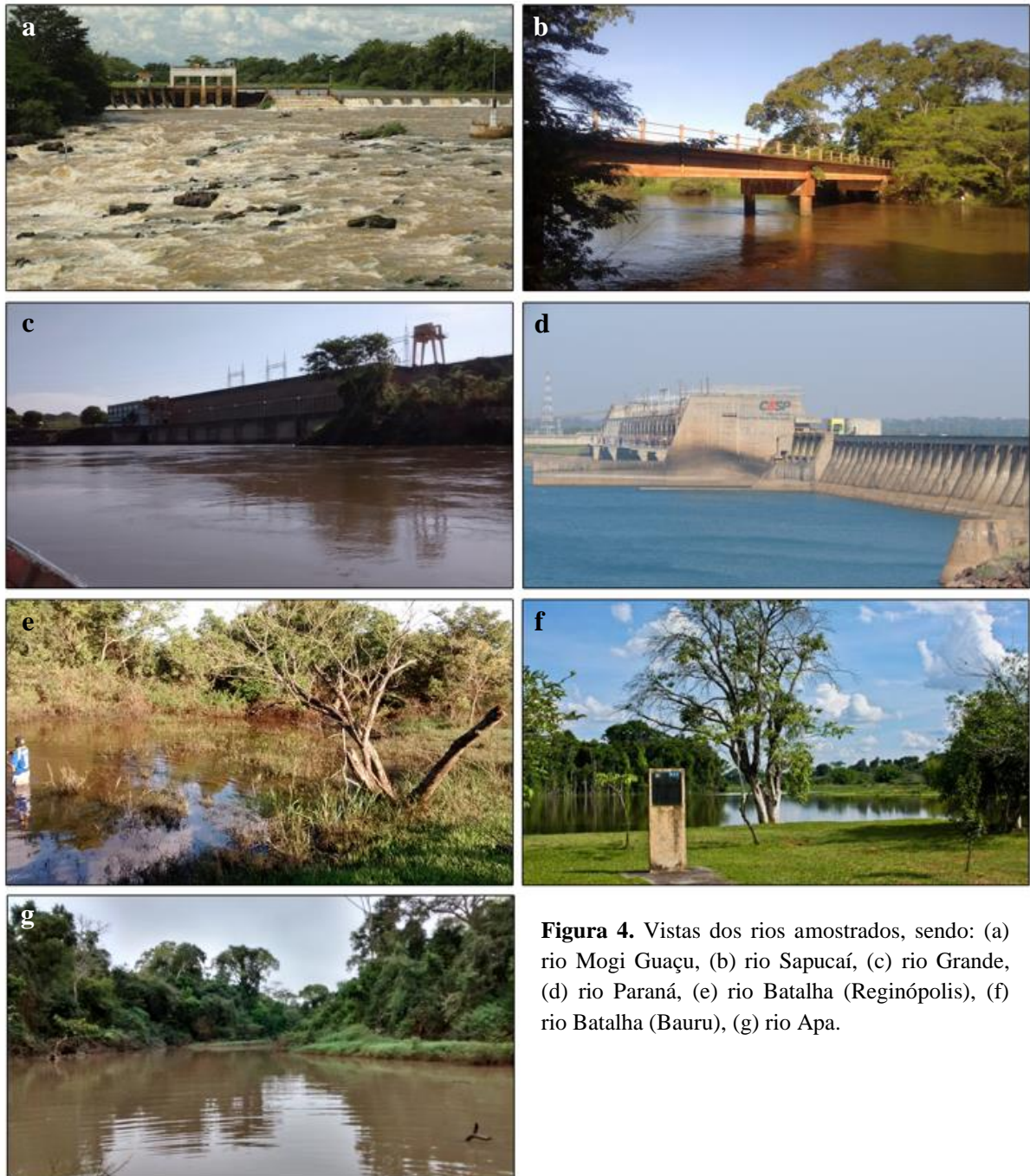
Foram amostrados exemplares de *P. lineatus* em sete localidades compreendendo porções do alto e baixo Paraná, incluindo importantes bacias como a do rio Grande, rio Tietê

e Paraguai. A bacia do rio Grande é uma região que apresenta intensa ação antrópica a respeito de construções de barragens para produção energética, até o presente momento foram construídas 13 barragens nesta área que conta com 1.072 km de extensão fluvial. Nesta bacia os exemplares foram coletados no rio Mogi Guaçu (N = 32), rio Sapucaí (N = 24) e rio Grande (N = 20).

Duas localidades foram amostradas na bacia do rio Tietê situadas ao longo do rio Batalha em dois pontos (Bauru e Reginópolis, N = 8 e N = 15, respectivamente). A amostragem conta também com um ponto de coleta na calha principal do rio Paraná (N = 30), o qual é composto basicamente de exemplares capturados pela Companhia Energética de São Paulo (CESP) e mantidos como matrizes reprodutoras para programas de repovoamento da Usina Hidrelétrica Eng. Souza Dias (Jupiá), no município de Três Lagoas – MS.



**Figura 3.** Localidades onde foram coletados exemplares de *P. lineatus*, sendo: (AP) rio Apa, (PA) rio Paraná, (GR) rio Grande, (SA) rio Sapucaí, (MG) rio Mogi-Guaçu, (RE) rio Batalha - Reginópolis, (BA) rio Batalha - Bauru.



**Figura 4.** Vistas dos rios amostrados, sendo: (a) rio Mogi Guaçu, (b) rio Sapucaí, (c) rio Grande, (d) rio Paraná, (e) rio Batalha (Reginópolis), (f) rio Batalha (Bauru), (g) rio Apa.

Por fim, o rio Paraguai é o maior afluente do rio Paraná e que até o momento não conta com barragens para produção de energia elétrica, portanto pode ser considerado um rio importante para a reprodução e conservação de espécies nativas. A amostragem da bacia do rio Paraguai está representada neste estudo por um importante afluente, o rio Apa (N = 20), o qual está situado na fronteira entre o estado do Mato Grosso do Sul e o Paraguai. Todos os pontos amostrados estão sumarizados nas Figuras 3 e 4.

### 3.3 Captura dos exemplares

Os exemplares de *P. lineatus* foram capturados nas populações naturais, sob autorização do MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO (n° de protocolo: 18884-1), e registro no IBAMA (n° 2567470), utilizando-se de tarrafas (malhas n° 10 e 12, 50 mm e 60 mm entre nós, respectivamente, Figura 5) e redes de espera (malhas n° 10 e 12, 50 mm e 60 mm entre nós, respectivamente, Figura 6). Além disso, alguns lotes de peixes (rios Mogi Guaçu, Grande e Paraná) após serem capturados da natureza foram estocados nos tanques do CEPTA/ICMBio, no município de Pirassununga-SP. Os exemplares do rio Sapucaí foram mantidos nos tanques da piscicultura Projeto Peixe, no município de Cravinhos/SP e alguns exemplares desta localidade também se encontram nos tanques do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) em Jaboticabal/SP.

Todos os espécimes mantidos em tanques foram devidamente catalogados e marcados com *tags* magnéticos para posterior identificação (Figura 8). Além disso, para realizar o manejo e captura dos exemplares mantidos como estoques foi utilizada rede de arrasto (Figura 7).



**Figura 5.** Coleta de exemplares de *P. lineatus* no rio Apa, utilizando tarrafa.



**Figura 6.** Coleta de exemplares de *P. lineatus* no rio Batalha, utilizando rede de espera.



**Figura 7.** Coleta de exemplares de *P. lineatus* nos tanques do CEPTA/ICMBio, Pirassununga - SP, utilizando rede de arrasto.

### 3.4 Métodos

#### 3.4.1 Marcação dos exemplares

Alguns exemplares utilizados para a caracterização citogenética são frequentemente utilizados como reprodutores em programas de repovoamento ou como bancos genéticos e,

portanto, não poderiam ser sacrificados, como é o caso das populações do rio Mogi Guaçu, Grande, Sapucaí e Paraná. Portanto, antes de realizar a amostragem citogenética pela técnica de cultura de linfócitos, a qual não requer sacrifício dos animais, os exemplares foram devidamente identificados com *tags* magnéticos, para evitar a repetição da análise do mesmo indivíduo.

Os *tags* são pequenos bastonetes de metal magnetizados (Figura 8), que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras, comumente empregado para identificação de diversos produtos. O procedimento de marcação dos exemplares segue o descrito por Porto-Foresti et al. (2001):

- 1) primeiramente deve-se anestésiar o animal em uma solução de 2 g de anestésico (benzocaína) em 20 l de água;
- 2) introduzir o *tag* na região lombar esquerda, perto da nadadeira dorsal do animal, com o auxílio de uma seringa injetora (Figura 8b);
- 3) pressionar o êmbolo, que desloca o *tag* para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal (Figura 8b);
- 4) após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário, este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor (Figura 8c). A identificação é feita passando-se o leitor sobre a região onde foi introduzido o *tag* e a leitura é feita diretamente no mostrador;

No caso da morte do animal ou na desativação do experimento, os *tags* podem ser recuperados para serem reutilizados após sua limpeza. Este procedimento é realizado retirando-se o *tag* do animal, esterilizando-o em álcool 70% e colocando-o novamente na seringa injetora.



**Figura 8.** Identificação de exemplares utilizando marcadores magnéticos (*tags*); **a)** *tags* magnéticos; **b)** introdução de um pequeno *tag* na região dorsal do animal, perto da nadadeira, com o auxílio de uma seringa injetora que, ao ser pressionado o êmbolo, este desloca o *tag* para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal. Após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor (**c**).

### 3.4.2 Análises citogenéticas

Nas análises citogenéticas das amostras foram utilizados os métodos de cultura de linfócitos (Fenocchio e Bertollo, 1988), para realizar o levantamento cromossômico de peixes mantidos como banco genético ou estoque de matrizes reprodutoras (rio Mogi Guaçu, Grande, Sapucaí e Paraná). Os protocolos de estimulação de mitoses (Lozano et al. 1988; Oliveira et al. 1988), seguido por preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al. 1981) ou preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti et al., 1993) foram utilizadas nos demais pontos de coleta. Algumas adaptações foram realizadas nessas técnicas, ajustando-as para a espécie estudada.

#### 3.4.2.1 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos por meio de cultura de linfócitos

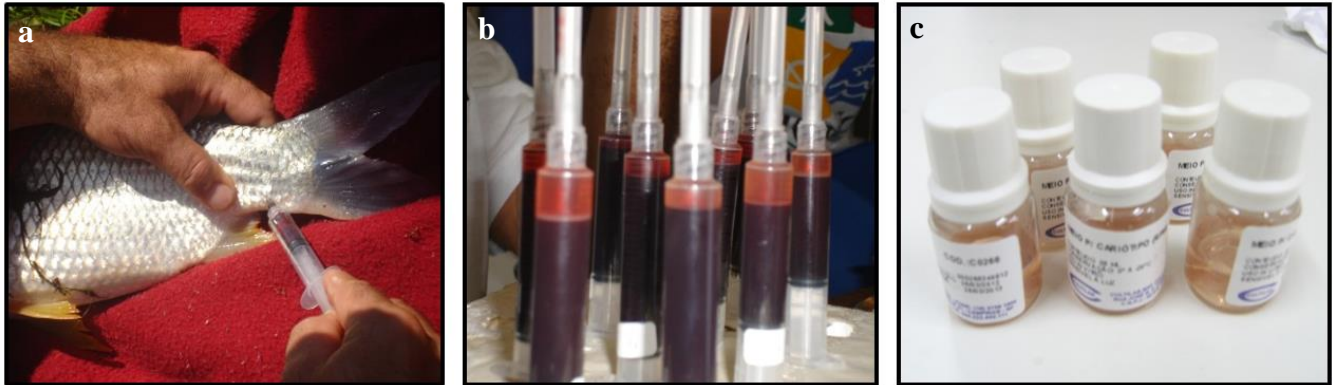
A cultura celular de linfócitos é muito utilizada para obtenção de preparações cromossômicas em várias espécies de animais. A mais importante característica desta técnica é que não há a necessidade de sacrificar o animal, sendo importante para cariotipagem de estoques de peixes mantidos como reprodutores ou espécies ameaçadas de extinção. A técnica utilizada foi a descrita inicialmente por Fenocchio e Bertollo (1988), no entanto, algumas



adaptações foram necessárias para a espécie em estudo. O protocolo desta técnica consiste em:

- 1)** anestésiar o animal com solução de benzocaína (100 mg/l);
- 2)** limpar a região caudal com álcool iodado e puncionar a veia caudal, retirando de 3 a 5 ml de sangue (Figura 9a);
- 3)** aguardar até separação do soro, linfócitos e hemácias (Figura 9b) e retirar os linfócitos para serem colocados na cultura. Descartar o soro e as hemácias;
- 4)** colocar os linfócitos em 5 ml de meio de cultura RPMI para cariótipo (Cultilab) (Figura 9c);
- 5)** incubar a cultura a cerca de 28°C por 3 dias;
- 6)** 15 minutos antes de colher a cultura, colocar uma gota de solução aquosa de colchicina a 0,025%;
- 7)** para colher o material, centrifugar por 7 minutos a  $700 \pm 100$  rpm e descartar o sobrenadante;
- 8)** acrescentar 7 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e agitar levemente;
- 9)** deixar o tubo no interior de uma estufa a 28 °C por 30 minutos;
- 10)** retirar da estufa, colocar 6 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com uma pipeta de Pasteur e deixar repousar por 5 min a temperatura ambiente;
- 11)** adicionar 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga ( $900 \pm 100$  rpm) por 10 minutos;
- 12)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a  $900 \pm 100$  rpm;
- 13)** repetir o item 12 por duas ou três vezes;
- 14)** pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar.

As lâminas são guardadas no freezer até o momento de aplicação da técnica de coloração.



**Figura 9.** Procedimentos para a realização da cultura de linfócitos: **a)** punção da veia caudal; **b)** separação do sangue em soro, linfócitos e hemácias; **c)** meios de cultura.

#### 3.4.2.2 Estimulação de mitoses

Em algumas preparações cromossômicas foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular, para obtenção de maior número de mitoses por inoculação de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980), para pequenos mamíferos e por Lozano et al. (1988) e Oliveira et al. (1988) nos peixes. O procedimento utilizado consiste em:

- 1) Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) Incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
- 3) Injetar a solução na região dorsolateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 h;
- 4) Manter o animal em aquário bem aerado.

3.4.2.3 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* foi descrita por Foresti et al. (1981) e utilizada com algumas modificações para esta espécie. O procedimento consiste em:

- 1) Injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml/100 g de peso do animal;
- 2) Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3) Anestesiá-lo em solução de benzocaína;
- 4) Sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCl (0,075 M);
- 5) Dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 6) Transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- 7) Retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 8) Adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 9) Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 10) Repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 11) Pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar.

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

#### 3.4.2.4 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro* por Foresti et al. (1993) e utilizada com algumas modificações para esta espécie. O procedimento consiste em:

- 1) anestesiar o animal em solução de benzocaína;
- 2) sacrificar o animal, retirando tecidos da parte anterior do rim, brânquias e testículos no caso dos machos;
- 3) colocar os tecidos retirados em placas de Petri contendo 6 ml de meio RPMI em temperatura ambiente;
- 4) dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, dissociar inicialmente o material com pinças de ponta fina e depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 5) retirar a suspensão celular da placa de Petri e transferi-la para um tubo de centrífuga. Acrescentar 1 gota de solução de colchicina a 0,05% e agitar levemente.
- 6) transferir o tubo para o interior de uma estufa a 37 °C por 15 min;
- 7) centrifugar o material a 1000 rpm por 8 min. Retirar e descartar o sobrenadante, acrescentar 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e agitar levemente;
- 8) retornar o tubo para o interior da estufa a 37°C por 30 min;
- 9) retirar o tubo contendo suspensão de células da estufa, adicionar 5 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente) e agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur. Deixar repousar por 5 min em temperatura ambiente;

- 10) adicionar cerca de 6ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (1.000 ± 100 rpm) por 10 minutos;
- 11) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador novo. Centrifugar por 7 minutos a 1.000 ± 100 rpm;
- 12) repetir o item 8 por duas ou três vezes e fazer a suspensão final;
- 13) pingar o material em lâminas;
- 14) deixar secar e proceder à coloração.

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

#### 3.4.2.5 Estudos cariotípicos

A partir dos dados obtidos através das análises e contagem dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo, procurou-se estabelecer um número diploide e a frequência de cada tipo de cromossomos B encontrados de cada exemplar em todas as localidades analisadas.

Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos, foram fotografadas em fotomicroscópio da marca OLYMPUS, modelo BX50 equipado com câmera digital (QColor5) e fotomicrografadas utilizando o programa cellSens Standard 1.14 (OLYMPUS).

### **3.5 Utilização de marcadores citogenéticos**

#### **3.5.1 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NOR) através da impregnação com nitrato de prata (Ag-NO<sub>3</sub>)**

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980) utilizando-se duas soluções:

Solução A: (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0.5 ml de ácido fórmico.

Solução B: (solução de nitrato de Prata): 1 g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 ml de água destilada.

Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NOR é o seguinte:

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min em HCl 1 N a 60°C;
- 2) secar as lâminas, pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3) deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C, por alguns minutos (aproximadamente 3) até a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;
- 4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 s;
- 5) deixar secar ao ar.

### **3.5.2 Caracterização da heterocromatina constitutiva**

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972) que consiste em:

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0,2 N em temperatura ambiente e posteriormente lavar com água destilada;
- 2) passar por uma solução de  $\text{BaOH}_2$  a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
- 3) banhar em HCl 1 N a 60°C e então lavar novamente com água destilada;
- 4) incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH = 6,8) a 60°C e lavar com água destilada;
- 5) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

### **3.6 Utilização de marcadores moleculares**

#### **3.6.1 Extração de DNA e quantificação das amostras**

As amostras de tecido (nadadeira caudal) de *Prochilodus* utilizadas neste presente trabalho foram empregadas em estudos moleculares. Foram utilizados protocolos de extração de DNA com kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification kit - Promega”. O DNA genômico total extraído foi quantificado em gel de agarose 1% por meio de comparações a partir do marcador “Low DNA Mass Ladder – Invitrogen”.

Após essa etapa, o resultado da extração e purificação de DNA genômico foi quantificado através do espectrofotômetro Nano Drop 1000 (Thermo Scientific), que forneceu a concentração das amostras, bem como sua pureza. A partir da amostragem e extração de DNA genômico foram aplicados marcadores moleculares do tipo microssatélite e mtDNA (região controle) em exemplares das localidades amostradas, a fim de analisar a estruturação populacional nesta espécie.

#### **3.6.2 Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de nadadeira**

- 1) numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2) retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3) adicionar 600 µl de “*Nuclei Lysis Solution*”;
- 4) adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;
- 5) levar ao banho-maria a 60°C por aproximadamente 2 horas; esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6) adicionar 2,5 µl de “RNase” e colocar no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;

- 7) adicionar 200 µl de “*Protein Precipitation Solution*” e misturar rapidamente no vórtex;
- 8) levar ao gelo por 5 minutos;
- 9) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10) remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11) inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA se tornem visíveis;
- 12) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13) adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;
- 14) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 15) descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 16) adicionar aproximadamente 30 µl de “*DNA Rehydration Solution*” por 1 hora a 65°C ou 24 horas a 4°C.

### 3.6.3 Seleção dos *loci* microssatélites

Para o estudo da diversidade genética entre as populações de *P. lineatus* envolvidas neste estudo foram selecionados seis *loci* de microssatélites previamente descritos na literatura para esta espécie (Rueda et al., 2011). Para a amplificação dos *loci* foi empregada a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando pares de *primers forward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 1).

As reações foram divididas em duas reações *multiplex* (Pl.14, Pl.64, Pl.190 e Pl.03 e Pl.34) e uma reação *singleplex* (Pl.139). As amplificações feitas em reações padrão foram realizadas basicamente em um volume total de 15 µl contendo as seguintes concentrações 1X



*buffer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de cada *primer*, 0,1 U de Taq DNA polimerase. Estas reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Seguindo as seguintes condições: desnaturalização inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um período de hibridação variando entre 52°C a 62°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1.** Sequências dos *primers*, número de alelos (Na), tamanho dos alelos (pb), temperatura de anelamento (TA), de sequências de microssatélites desenvolvidas para *P. lineatus* (Rueda et al., 2011).

<i>Locus</i>	Repetição	Sequência do primer (5'-3')	Na	pb	TA(°C)
Pl.03	(CA) <sub>n</sub>	F:5'CTGAGCTGTGAGGAATGGA 3' R:5'AGAGCGCTCAAGCACAAGAT 3'	06	185-203	58
Pl.14	(CA) <sub>n</sub>	F:5'TGCCCAACACTGAACTGAG 3' R:5'CTCATCAACCTGCCTGGAAT 3'	11	104-134	62
Pl.34	(CA) <sub>n</sub>	F:5GAGCGGATTCTCCACATGAT 3' R:5'TAATGTGCTCCCTCCACAG 3'	10	178-212	58
Pl.64	(CA) <sub>n</sub>	F:5'AGAGCAACACAGGGAGGAGT 3' R:5'ACGCTCTGCTCAGCCATACT 3'	13	158-180	62
Pl.139	(CA) <sub>n</sub>	F:5'CAGTGGCATGATGATTAGATGG 3' R:5'CACCTTTTGTGGCTTTTAGG 3'	20	169-235	52
Pl.190	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'GCTTGGGAGCCTATTCATCC 3' R: 5'GGGTTTCTGCACCATACAGG 3'	22	197-227	62

Uma vez conhecidas as características de cada *locus*, foram feitos sistemas de sequenciamento em conjunto, levando em consideração o tamanho (pb) para cada *locus*. Respeitando essas características, cada *locus* teve o *primer reverse* (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PET<sup>™</sup>, FAM<sup>™</sup> e VIC<sup>™</sup>. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo (Tabela 2).

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) e analisados inicialmente no programa GeneMapper versão 4.0 (Applied Biosystems) e posteriormente revisados manualmente.

**Tabela 2.** Relação de conjuntos de sequenciamento na qual cada *locus* e o tipo de fluorocromo da posição 5' de cada *primer reverse*. TA = temperatura de anelamento.

<i>Primer</i>	Fluorocromo	<i>Multiplex</i>	TA(°C)
Pl.14	FAM	1	62
Pl.64	VIC	1	62
Pl.190	PET	1	62
Pl.03	FAM	2	58
Pl.34	VIC	2	58
Pl.139	FAM	3	52

### 3.6.4 Análises populacionais utilizando microssatélites

O número de indivíduos analisados, número de alelos e valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) foram obtidos através do programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998). Riqueza alélica foi obtida através do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Os valores de  $F_{is}$  (coeficiente de endogamia) e os cálculos de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram analisados através de testes exatos de Fisher, implementados no programa GenePop 4.6.9 (Rousset, 2008). Para verificar a ocorrência de alelos nulos utilizou-se o programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Os valores de significância ( $P < 0.05$ ) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

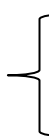
Para investigar a ocorrência de estruturação genética entre as populações de *P. lineatus* foram obtidos os índices de  $F_{ST}$  assumindo o modelo de alelos infinitos (IAM) para todos os *loci* e para todas as populações no programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). Neste mesmo programa foram realizados testes de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al.,

1992) para verificar a distribuição da variação entre populações, grupos de populações e dentro de populações. As significâncias foram testadas por 1.000 permutações.

Análises Bayesianas foram conduzidas através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para verificar o número real de populações (K) entre as amostras de cada população. Foi utilizado o modelo de ancestralidade não misturada (no *admixture model*) a fim de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações (K) e é mais indicado para verificar uma estruturação populacional sutil (Pritchard et al., 2000). Foram utilizados alelos correlacionados, 20 réplicas para cada valor de K, 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com períodos de *burn-in* de 200.000, e assumindo K= 1 a 8.

### 3.6.5 Amplificação da região controle (mtDNA)

A região controle foi amplificada via reação de PCR utilizando os *primers* F-TTF (5'-GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA-3') e F-12R (5'-GTCAGGACCATGCCTTTGTG-3'), descritos previamente por Sivasundar et al. (2001) e para o sequenciamento foi utilizado também o *primer* adicional interno CR1 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'). A amplificação da região controle foi feita em um volume final de 50 µl utilizando 150 ng de DNA genômico, 1,25 u de *Taq* DNA polimerase (Applied Biosystems), 1 X PCR *buffer* sem MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 mM de cada dNTP. Os parâmetros para amplificação seguiram o seguinte programa:

	95°C ----- 10 minutos (desnaturação inicial)	
35 ciclos	 95°C ----- 1 minuto (desnaturação) 65°C ----- 1 minuto (anelamento) 72°C ----- 1 minuto (extensão)	
		72°C ----- 5 minutos (extensão final)

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 DNA (2,5 µL/ml), e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera Olympus, C-5060.

### 3.6.6 Purificação do produto de PCR (mtDNA região controle)

As amostras amplificadas pela reação de PCR foram purificadas por meio da enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation). Para isto, 5 µl do produto amplificados foram colocados em um microtubo (0,2 ml) e posteriormente adicionado 2,0 µl da solução de purificação (0,13 µl de ExoSap + 1,87 µl de água ultrapura). As amostras foram colocadas em termociclador por 1 hora a 37°C seguida de 15 minutos à 80°C.

### 3.6.7 Reação de sequenciamento (mtDNA região controle)

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit “*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems) com os *primers* F-12R e CR1, nas seguintes concentrações:

- 1) 1,0 µL do DNA amplificado (concentração de aproximadamente 40ng);
- 2) 0,35 µL de cada *primer* (F-12R e CR1 na concentração de 10 µM);
- 3) 0,7 µL de *BigDye Terminator*;
- 4) 1,05 µL de Tampão 5X para sequenciamento;
- 5) 3,9 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura.

Após a mistura dos reagentes com os DNA amplificados o material foi colocado no termociclador conforme o seguinte programa:

	96°C ----- 2 minutos (desnaturação inicial)
35 ciclos	96°C ----- 30 segundos (desnaturação)
	50°C ----- 15 segundos (anelamento)
	60°C ----- 4 minutos (extensão)
	12°C ----- manutenção

### 3.6.8 Purificação das amostras amplificadas

Posteriormente a reação de sequenciamento as amostras foram submetidas a uma etapa de purificação eliminando os excessos de reagentes utilizados, seguindo o seguinte protocolo:

- 1) primeiramente adicionou-se 0,7  $\mu\text{L}$  de EDTA (125 mM) e 0,7  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (3 M) a cada amostra;
- 2) então acrescentou-se 17,5  $\mu\text{L}$  de etanol 100% para posterior incubação por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 3) em seguida centrifugou-se por 75 minutos a 3.500 rpm à 25°C, descartando o sobrenadante posteriormente;
- 4) novamente as amostras foram colocadas na centrifuga para um spin invertido por 1 minuto a 1.250 rpm;
- 5) adicionou-se 24,5  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado e centrifugou-se por 18 minutos a 3.500 rpm à 25°C, sendo retirado o sobrenadante posteriormente;
- 6) novo *spin* invertido foi realizado na centrifuga por 2 minutos a 1.250 rpm.
- 7) por último as amostras foram colocadas no termociclador por 8 minutos a 96°C com a tampa do termociclador aberta (para a completa evaporação do etanol);
- 8) as placas foram guardadas na geladeira envoltas em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

Após esta etapa as amostras foram analisadas em um sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), sendo que para cada amostra foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de

formamida, sendo desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas ao sequenciamento seguindo recomendações sugeridas pelo fabricante.

### 3.6.9 Análise populacional utilizando a região controle

Primeiramente, as sequências foram alinhadas e as regiões variáveis checadas manualmente utilizando o programa SEQSCAPE 2.5 (Applied Biosystems), utilizando como referência o sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *P. lineatus* (número de acesso GenBank KM245045, publicado por Carmo et al., 2014). Além disso, foi utilizado o jModelTest (Santorum et al., 2014) para verificar qual modelo de substituição nucleotídica seria o mais adequado para esta região. As sequências obtidas foram alinhadas com o módulo ClustaW (Thompson et al., 1997) no programa BioEdit v.7.2.6 (Hall, 1999).

Os haplótipos foram identificados utilizando o programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009) e a rede de haplótipos foi construída no programa NETWORK (disponível em: <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). A análise de variância molecular (AMOVA), diversidade haplotípica ( $h$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), comparação populacional utilizando o teste de Tamura (Tamura, 1992) e índice de diferenciação populacional ( $\Phi_{ST}$ ) foram estimados utilizando o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005).

Além disso, também foi construída uma árvore de *neighbor-joining* a partir da matriz de dados de  $\Phi_{ST}$ . A árvore foi visualizada pelo programa TreeView 3.2 (Page, 1996). O teste de isolamento por distância (IPD) foi conduzido utilizando  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  (Rousset, 1997) com a distância geográfica pelo teste de Mantel no programa NTSYS (Rohlf, 1993) com 10.000 permutações. Os níveis de significância ( $P < 0,05$ ) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

### 3.6.10 Análise populacional utilizando os cromossomos B como marcadores

No presente estudo utilizamos os cromossomos B como marcadores populacionais no intuito de comparar os dados citogenéticos sobre a frequência e distribuição dos três tipos de Bs encontrados em *P. lineatus* (meta, submeta e acro) com dados moleculares utilizando marcadores populacionais (microsatélites e mtDNA). Para obter o valor de diferenciação populacional ( $F_{ST}$ ) foi utilizado o método proposto por Castro et al. (2001) sobre análise populacional baseado no polimorfismo de NORs em trutas. Portanto, consideramos cada tipo de cromossomo B como sendo um *locus* e a variação na frequência das variantes de B como seus alelos.

Os valores de  $F_{ST}$  entre as populações foram calculados utilizando o programa Genepop 4.6.9 (Rousset, 2008). Árvores de *neighbor-joining* foram construídas utilizando o programa TreeView v. 3.2 (Page, 1996) a partir de dados obtidos pela matriz de distância genética de Nei (Da; Nei, 1987) entre as localidades e o valor de  $F_{ST}$ . Além disso, foi realizado um teste de isolamento por distância entre as localidades amostradas comparando os valores de  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  (Rousset, 1997) com os valores de distância geográfica utilizando o teste de Mantel no programa NTSYS (Rohlf, 1993) com 10.000 permutações.

Por fim, também foi feita uma análise de DAPC (*Discriminant analysis of principal components*) (Jombart et al., 2010), a qual se trata de um método multivariado concebido para identificar e descrever agrupamentos de indivíduos geneticamente relacionados.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão relacionados a ocorrência dos cromossomos B nos peixes neotropicais, caracterização citogenética e populacional envolvendo os Bs em *Prochilodus lineatus* encontram-se organizados na forma de três capítulos, que são apresentados a seguir.

### **Capítulo 1**

Cromossomos B: uma revisão em peixes de águas continentais do Neotrópico

### **Capítulo 2**

Estudos citogenéticos em *Prochilodus lineatus*: conservação cariotípica, distribuição e hipóteses sobre a origem dos cromossomos B

### **Capítulo 3**

Estrutura populacional em *Prochilodus lineatus*: uma nova abordagem utilizando cromossomos B e marcadores moleculares



## **CAPÍTULO 1**

### **Cromossomos B: uma revisão em peixes de águas continentais do Neotrópico**

#### **RESUMO**

Os cromossomos B são elementos acessórios e estão amplamente distribuídos entre os genomas dos eucariotos. São descritos em 73 espécies de peixes Neotropicais, distribuídas em 20 famílias de 6 diferentes ordens. A ordem dos Characiformes representa o maior número de espécies portadoras de cromossomos B, com quase 50% do total de descritos. Sua estrutura, origem, função, manutenção e comportamento são particulares nos diferentes grupos, tornando-se difícil uma conclusão geral entre as espécies portadoras. Atualmente com os avanços metodológicos, como reprodução induzida, microdissecção cromossômica e sequenciamentos de nova geração, o enigma dos supranumerários está sendo mais bem interpretado diante de alguns resultados, seja sob seu aspecto de herança, estrutura ou origem. Na citogenética de peixes Neotropicais, estas metodologias ganharam força apenas recentemente e diversos estudos vêm sendo realizados sobre a problemática dos cromossomos B em diversas espécies de peixes.

## **Introdução**

Cromossomos B são elementos adicionais ao conjunto de cromossomos normais, sem função aparente e que apresentam herança não-mendeliana, sendo encontrados em vários grupos dentro dos eucariotos (Houben et al., 2014). No entanto, apesar da sua ampla ocorrência, a biologia dos cromossomos B ainda é pouco conhecida. De forma geral, estes elementos podem ser encontrados em alguns indivíduos de uma determinada população além de apresentar variações numéricas e estruturais tanto intra quanto interindividuais.

Inicialmente, e até há pouco tempo, os cromossomos B foram considerados como elementos não-funcionais, sem conter genes essenciais, uma vez que são dispensáveis para o crescimento normal de seu portador, além disso, a maioria dos Bs não conferem quaisquer vantagem sobre os organismos que os mantêm (Houben et al., 2014), podendo ser pensados como parasitas ou elementos egoístas que persistem nas populações, fazendo uso da maquinaria celular necessária para a herança e a manutenção deste tipo cromossômico (Cabrero et al., 2013). Quando presentes em número reduzido, os supranumerários geralmente têm pouco ou nenhum impacto sobre os portadores, no entanto, um aumento do número dos cromossomos B podem causar diferenças fenotípicas e reduzir a fertilidade em alguns casos (Camacho et al., 2000; Jones e Houben, 2003; Camacho, 2005).

Jones (2017) descreveu a ocorrência de cromossomos B em 1.685 espécies de eucariotos. Dentre os animais, cromossomos B são descritos em 500 espécies (Camacho, 2005). O grupo de animais mais bem caracterizado são os Artrópodes, classe Insecta, com os Orthoptera representando 92 espécies, Diptera 42, e Coleoptera 40 espécies. Em mamíferos 55 espécies são portadoras de supranumerários, onde os roedores são os mais representativos (Vujosevic e Blagojevic, 2004). Adicionalmente, a ampla ocorrência de cromossomos B em fungos sugere que estes são provavelmente onipresentes dentre os eucariotos, porém, até o

momento poucos estudos citogenéticos foram realizados nestes organismos (Camacho, 2005). Dentre os peixes, a ocorrência de cromossomos B foi descrita apenas em duas espécies da região Paleártica (Taylor 1967; Hafez et al., 1978), entretanto, são descritos em inúmeras espécies de peixes neotropicais, pertencentes a diferentes famílias e ordens.

Uma das primeiras descrições de cromossomos com características pertinentes à supranumerários em peixes neotropicais refere-se aos cromossomos adicionais observados por Pauls e Bertollo (1983) na espécie *Prochilodus lineatus*. Desde então, diversos estudos vêm sendo intensificados no intuito de descrever a ocorrência de cromossomos B em novas espécies. Além disso, com o advento de diversas técnicas modernas e sofisticadas várias pesquisas vêm contribuindo para a elucidação do enigma dos cromossomos B ao longo dos anos. Apesar disso, ainda existem poucos trabalhos conclusivos sobre a problemática dos supranumerários, principalmente em peixes.

Algumas revisões anteriores sobre a ocorrência dos Bs nos peixes neotropicais foram feitas previamente por Carvalho et al. (2008) (61 espécies) e Oliveira et al. (2009) (38 espécies). Entretanto, os dados de Carvalho et al. (2008) lavaram em consideração muitas ocorrências a partir de dados não publicados, enquanto que Oliveira et al. (2009) levou em consideração apenas dados provenientes de artigos científicos. Portanto, com o aumento do número de estudos focados na problemática dos Bs nos peixes neotropicais e a descrição novas ocorrências destes elementos genômicos, uma nova revisão se faz necessária. Sendo assim, esta revisão descreve dados recentes da literatura relacionados aos estudos que foram e vêm sendo realizados atualmente para o entendimento dos cromossomos supranumerários em peixes dulcícolas do Neotrópico.

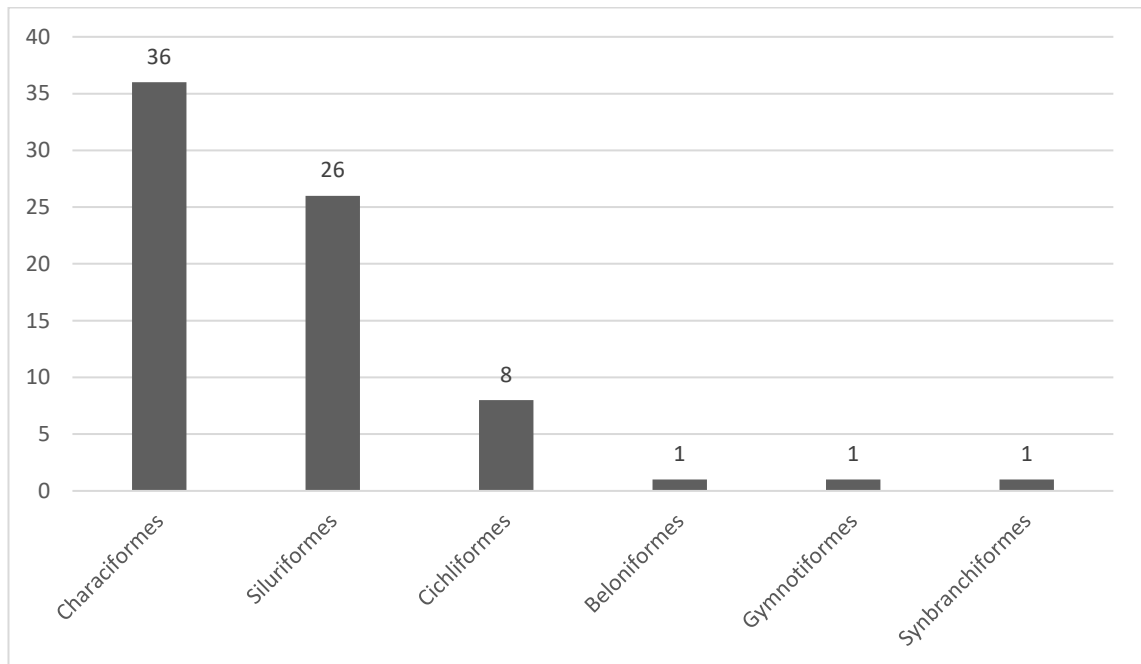
## **Ocorrência de cromossomos B em peixes neotropicais**

Os teleósteos representam mais da metade entre todos os vertebrados existentes, com aproximadamente 32.500 espécies conhecidas e, desta forma, é considerado o grupo mais diversificado que habita os vários ambientes aquáticos (Nelson, 2006). A ictiofauna Neotropical é extremamente rica em peixes com a estimativa de 9.100 espécies Reis et al., (2016). Atualmente estão identificadas 5.160 espécies válidas de peixes de águas continentais para o Neotrópico, distribuídas em 20 ordens, 69 famílias e 739 gêneros (Reis et al., 2016). De acordo com Reis et al., (2016) o número de espécies de peixes de águas neotropicais dulcícolas corresponde a aproximadamente 27% de todas as espécies de peixes do mundo. Além disso, Vari e Malabarba (1998) mostraram que toda esta diversidade ocorre somente em uma pequena parcela de toda a água doce do planeta (0,03%).

Em particular, a problemática dos cromossomos B despertou e vem despertando cada vez mais interesse na comunidade científica ictiológica, uma vez que são considerados elementos genéticos aparentemente dispensáveis, entretanto, persistem na população e não são eliminados por meio da seleção natural.

A maior abundância de cromossomos B dentre os peixes concentra-se na ordem dos Characiformes, os quais são descritos em oito famílias distintas: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Erythrinidae, Parodontidae, Prochilodontidae e Serrasalminidae, totalizando 36 espécies, conforme ilustrado na Tabela 1 e Apêndice 1. Cromossomos B também são descritos na ordem dos Siluriformes, evidenciados em 26 espécies pertencentes às famílias Auchenipteridae, Callichthyidae, Doradidae, Heptapteridae, Loricariidae, Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Trichomycteridae (Tabela 1, Apêndice 1). Em outras ordens de peixes como nos Cichliformes, oito espécies da família Cichlidae são portadoras de cromossomos B (Tabela 1, Apêndice 1); Beloniformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes

são representadas com apenas uma espécie cada portando supranumerários, conforme exemplificado na Tabela 1 e Apêndice 1. Portanto, a ocorrência de supranumerários em peixes Neotropicais foi documentada para 73 espécies de diferentes ordens. Os Characiformes apresentaram a maior ocorrência, representando 49,3% do total descrito, este número pode estar relacionado diretamente por ser o grupo mais estudado dentro da citogenética de peixes Neotropicais. Os Siluriformes compreenderam 35,6% dos peixes portadores. Os Cichliformes representaram 10,9%. Beloniformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes apresentaram-se na proporção de 1,4% cada (Figura 1).



**Figura 1.** Frequência dos Bs nas ordens de peixes Neotropicais.

Mediante os diversos registros de supranumerários em peixes, podemos destacar sua notável variação morfológica e tamanhos diversificados. No Apêndice 1, podemos observar estas características em espécies do gênero *Astyanax*, com supranumerários de tamanho macro, micro e médios, além disso, apresentaram morfologias meta, submeta e acrocêntricas. Todavia, vale salientar que o cromossomo B metacêntrico é o mais predominante em todas as ordens analisadas.

**Tabela 1.** Ocorrência dos cromossomos B nas ordens e famílias de peixes neotropicais

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Total</b>
<b>Characiformes</b>		<b>36</b>
	Anostomidae	3
	Characidae	15
	Crenuchidae	6
	Curimatidae	2
	Erythrinidae	1
	Parodontidae	2
	Prochilodontidae	6
	Serrasalmididae	1
<b>Siluriformes</b>		<b>26</b>
	Auchenipteridae	1
	Callichthyidae	2
	Doradidae	3
	Heptapteridae	9
	Loricariidae	5
	Pimelodidae	4
	Pseudopimelodidae	1
	Trichomycteridae	1
<b>Cichliformes</b>		<b>8</b>
	Cichlidae	8
<b>Beloniformes</b>		<b>1</b>
	Belonidae	1
<b>Gymnotiformes</b>		<b>1</b>
	Apteronotidae	1
<b>Synbranchiformes</b>		<b>1</b>
	Synbranchidae	1
Total = 73 espécies		

Além da variação de tamanho e tipos morfológicos mencionados, os cromossomos B em peixes neotropicais também podem variar na frequência, tanto intra quanto interindividualmente. Em *Moenkhausia sanctaefilomenae* há uma variação intraindividual de até oito cromossomos (Foresti et al., 1989; Hashimoto et al., 2012), enquanto que em *P. lineatus* não há variação intraindividual nos cromossomos B devido a estabilidade mitótica

que ocorre nos Bs desta espécie (Oliveira et al. 1997; Voltolin et al., 2010b). Erdtmann et al., (1990) descreveram a ocorrência de até dezesseis micro cromossomos B em *Callichthys callichthys*. Porém em espécies do gênero *Astyanax*, o padrão mais comum descrito é a ocorrência de apenas um supranumerário (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Néó et al., 2000; Moreira-Filho et al., 2001; Hashimoto et al., 2008; Daniel et al. 2013).

Entretanto, a informação citogenética disponível aproximada é de apenas 475 espécies de Characiformes, 318 de Siluriformes, 48 de Gymnotiformes, 199 espécies dulcícolas que não pertencem a superordem Ostariophysi e 109 espécies de peixes marinhos (Oliveira et al., 2009). Portanto, a ocorrência de cromossomos B pode ser estimada entre 7 a 10% dos peixes do Neotrópico baseado nos dados aqui apresentados, pois ainda há uma grande carência em estudos citogenéticos básicos nos peixes neotropicais. Além disso, os cromossomos B podem ocorrer em uma baixa frequência ou ausência em algumas populações, sendo necessária uma intensificação de estudos citogenético-populacionais, o que dificulta a identificação de supranumerários em novas espécies portadoras.

## **Origem dos supranumerários em peixes Neotropicais**

### *Hipóteses sobre o surgimento dos supranumerários*

Não existe uma elucidação definitiva quanto a origem dos cromossomos B, e há muitas hipóteses que tentam explicar os diversos caminhos que teriam originado. É provável que tiveram distintas origens nos diversos organismos portadores. Dentre os trabalhos realizados acerca desta especulação, duas hipóteses gerais têm sido propostas. Na primeira, de origem intraespecífica (Jamilena et al., 1994, 1995; Peppers et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Camacho et al., 2000, Daniel et al., 2013, Silva et al., 2013, Penitente et al., 2016a), os cromossomos B surgiram do complemento A, porém seguiram caminhos evolutivos distintos.

Na segunda hipótese, de origem interespecífica (Sapre e Deshpande, 1987; Eickbush et al., 1992; McVean, 1995; Scharl et al., 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001, Tosta et al. 2015), os cromossomos B teriam surgido a partir de acasalamentos interespecíficos em um processo de hibridização.

Volobujev (1981) propôs duas hipóteses para explicar o surgimento destes elementos genômicos. A primeira sugere que os cromossomos B poderiam ser resquícios de rearranjos estruturais ocorridos durante a evolução de um cariótipo ancestral. A segunda propõe que estes cromossomos adicionais seriam resultados de processos de não-disjunção cromossômica de cromossomos sexuais ou autossômicos, seguido por processos de inativação genética. Variáveis da teoria intraespecífica obtiveram um enorme embasamento nos estudos de cromossomos B em peixes, os quais sugerem a origem dos cromossomos B por isocromossomos (Mestriner et al., 2000; Néó et al., 2000; Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006; Vicari et al., 2011; Daniel et al., 2013, Silva et al., 2013). Ainda, Burt e Trivers (2006) sugerem que os cromossomos B derivam de cromossomos A, e são mantidos em seus portadores como elementos parasíticos ou DNA "egoísta".

Contudo, hipóteses alternativas sobre a origem dos cromossomos B têm surgido em decorrência do conhecimento da estrutura molecular e identidade de fragmentos livres de DNA de origem não-cromossômica comumente encontrados no núcleo celular. A hipótese de que estes segmentos genômicos tenham surgido *de novo*, a partir de processos de construção e desmanche de segmentos genômicos nucleares em processos fisiológicos normais das células num modelo de desenvolvimento independente também deve ser considerada.

#### *Estudos envolvendo a origem dos supranumerários em peixes Neotropicais*

Pesquisas primordiais sobre a origem dos cromossomos B em peixes foram realizadas utilizando exemplares de *Poecilia formosa*. Análises citológicas revelaram que os



microcromossomos B em gerações filiais de *P. formosa* surgiram como resultado de uma incompleta eliminação do genoma parental (Schartl et al., 1995). Salvador e Moreira-Filho (1992) foram os pioneiros a propor uma hipótese para tentar explicar a origem dos supranumerários em peixes Neotropicais, especificamente em *Astyanax scabripinnis*, onde hipotetizaram que a origem deste cromossomo adicional poderia estar associada a um processo de heterocromatização, posteriormente comprovada por bandamento C.

Mestriner et al. (2000) e Néo et al. (2000) disporo da utilização da sonda As51, obtida a partir da utilização da enzima de restrição *KpnI*, detectaram a presença de sequências repetitivas em ambos os braços do cromossomo B, de modo semelhante ao par 24 do conjunto cromossômico (A) em *A. scabripinnis*, levantando argumentos favoráveis à origem dos supranumerários a partir da formação de um isocromossomo.

Vicari et al. (2011) também estudaram a origem dos cromossomos B em *A. scabripinnis* a partir da utilização de uma sonda específica do supranumerário desta espécie, obtida por microdissecção cromossômica; além disso, os autores também utilizaram a sonda As51 e sondas de DNAr 5S e 18S. Segundo os autores, os resultados permitem inferir uma origem intraespecífica do supranumerário desta espécie, entretanto, sua precisa origem a partir de cromossomos autossomos não pode ser elucidada, diferentemente dos resultados observados por Mestriner et al. (2000) e Néo et al. (2000).

Jesus et al. (2003) também estudaram a estrutura e origem dos microcromossomos B em *Prochilodus lineatus*, utilizando a enzima de restrição *HindIII*. Após a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH), com o emprego das sondas SATH1 e SATH2 obtidas pela digestão enzimática, demonstraram que o DNA satélite SATH1 é compartilhado entre os cromossomos A e B desta espécie, embora nem todos os segmentos heterocromáticos dos cromossomos B sejam compostos por DNA SATH1, sugerindo que outras famílias de DNA repetitivo possam estar presentes nestes cromossomos. Artoni et al. (2006) ao utilizarem o

DNA satélite SATH1 em exemplares de *P. lineatus* de outras localidades, observaram que os sinais da sonda SATH1 apresentaram algumas diferenças nesta população quando comparados aos resultados observados por Jesus et al. (2003). As diferenças entre estas duas populações evidenciaram que os cromossomos B podem apresentar uma evolução independente nesta espécie.

O estudo sobre a origem de supranumerários abordando a utilização de sondas a partir da microdissecção cromossômica associada à FISH foi inicialmente adotado por Voltolin et al. (2010c) na espécie *P. lineatus*. Os autores observaram marcações apenas nos supranumerários, porém com diferentes graus de homologia. Diante disso, sugeriram uma suposta origem interespecífica do cromossomo B para *P. lineatus*. Entretanto, a origem intraespecífica onde estes elementos extras acumularam inúmeras modificações ao longo dos anos apresentando um DNA totalmente diferente dos possíveis cromossomos ancestrais que o originou não pode ser descartada. Posteriormente, diferentes autores abordaram metodologias associadas à microdissecção cromossômica de supranumerários, tais como Voltolin et al. (2013), Santos et al. (2013), Silva et al. (2013), Pansonato-Alves et al. (2014), Penitente et al. (2016a), entre outros.

A microdissecção cromossômica associada à Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH), ampliações e sequenciamento massivo de sequências a partir do DNA microdissectado, entre outros, são ferramentas de extrema importância na obtenção de informações relevantes sobre a estrutura molecular e de sequências acerca da origem e evolução dos supranumerários em peixes.

## Herança, comportamento e manutenção dos supranumerários em peixes Neotropicais

Durante a meiose, os cromossomos homólogos se pareiam formando bivalentes que posteriormente se segregam na primeira divisão. Em contraste, nem sempre existe pareamento entre os cromossomos B e sua invasão e manutenção no genoma são resultados de um comportamento individual do tipo univalente (Camacho, 2005), exceto em alguns casos raros, onde se observa translocações entre cromossomos A e B, como ocorre em centeio (Pohler e Schlegel, 1990). Ao invés de se dividirem de acordo com o modelo mendeliano, os univalentes são livres para segregarem-se, preferencialmente para um polo meiótico específico, resultando em um padrão de transmissão maior que a expectativa mendeliana (Camacho, 2005). Diante destes diferentes modelos de transmissão, os cromossomos B são considerados os elementos genéticos parasitas mais conhecidos no genoma (Camacho, 2005).

Estudos quanto à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes são ainda bastante escassos na literatura. Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração de herança paternal ginogenética em *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995). Somente Oliveira et al. (1997), Voltolin et al. (2010b) e Penitente et al. (2013, 2016b) realizaram estudos sobre a transmissão dos cromossomos B em peixes Neotropicais, utilizando a espécie *Prochilodus lineatus* como modelo biológico, e verificaram que a taxa de transmissão destes micro cromossomos foi consistente com a expectativa do comportamento regular meiótico dos cromossomos B em ambos os sexos, de acordo com a taxa de transmissão mendeliana (0,50).

Uma taxa de transmissão mendeliana ( $k_B = 0,48$ ) foi observada por Voltolin et al. (2010a) ao estudarem o comportamento mitótico dos supranumerários de *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu. Este valor classifica os cromossomos B em um estágio de neutralização conforme já proposto por Camacho et al. (1997) e Zurita et al. (1998), ou seja, para garantir a

permanência os supranumerários sofrem mutações em seu DNA desencadeando um processo coevolutivo entre supranumerários e genoma hospedeiro. No entanto, se tais processos mutacionais não ocorrerem ao longo das sequências de seu DNA esse pode desaparecer da população. O estágio de neutralização o qual se encontram os supranumerários dos curimbatás do rio Mogi Guaçu já havia sido previsto por Oliveira et al. (1997) e Cavallaro et al. (2000), e foi posteriormente confirmado por Voltolin et al. (2010a).

Cromossomos B neutralizados são caracterizados por aqueles que não apresentam mecanismos de acumulação e podem persistir por um longo período de tempo nas populações naturais antes de sua extinção, podendo ser regenerado por mutações (Camacho et al., 1997; Zurita et al., 1998). Este ciclo que engloba as fases de invasão, neutralização e extinção/regeneração, foi proposto por Camacho et al. (2000) como um modelo geral da dinâmica evolutiva dos supranumerários, que integram os modelos propostos para explicar a manutenção dos cromossomos B em populações naturais. Raros são os estudos que classificam os supranumerários dos diversos peixes Neotropicais portadores de cromossomos B em estágios invasivos, neutro, extinção/regeneração.

Em um dos poucos estudos existentes sobre herança e manutenção dos diferentes tipos de cromossomos B em peixes Neotropicais, podemos citar o trabalho de Penitente et al. (2013, 2016a), que ao estudarem a frequência e padrão de transmissão de três variantes morfológicas de supranumerários em *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu entre os anos 2004-2007, constataram uma predominância dos tipos B-metacêntrico (53,18%), e B-submetacêntrico (40,48%), comparados com o tipo B-acrocêntrico (6,34%). Os autores efetuaram análises do padrão de transmissão ( $k_B$ ) envolvendo cruzamentos controlados para averiguar a herança de cada variante de B, e constataram um menor  $k_B$  dos cromossomos B-acrocêntricos ( $k_B = 0,388$ ), apresentando uma taxa menor que a mendeliana ( $k_B = 0,500$ ). Por outro lado, os morfotipos B-metacêntrico e B-submetacêntrico apresentaram um padrão de transmissão

neutro ( $k_B = 0,507$  e  $k_B = 0,526$ , respectivamente). Penitente et al. (2013) propõem ainda que o cromossomo B-acrocêntrico estaria em fase de extinção, uma vez observado seu baixo padrão de transmissão, e conseqüentemente baixa frequência, o que poderia levar à sua extinção, caso não ocorram mutações em sua estrutura, fazendo com que dessa forma, permaneçam nesta população. Além disso, estes autores fizeram uma nova análise nesta população nos anos de 2011 e 2012 (ver em Penitente et al., 2016b) e notaram que ocorreu um aumento do tipo B metacêntrico e redução dos demais tipos, estes resultados fornecem evidências de que esses cromossomos estão passando por um ciclo dinâmico de invasão e extinção dentro da mesma população. Algumas formas de cromossomos B tendem a uma provável extinção, enquanto outras, apesar da sua natureza parasítica, são mantidas na população em detrimento de estratégias de acumulação. Entretanto, para um melhor entendimento sobre a transmissão dos cromossomos B nas populações é crucial o entendimento sobre o comportamento destes elementos durante a meiose.

Dentre os dados disponíveis sobre comportamento meiótico dos supranumerários em peixes Neotropicais presentes na literatura, podemos destacar o trabalho pioneiro de Dias et al. (1998) em *P. lineatus*. Os autores demonstraram que os supranumerários nesta espécie não se pareiam com os cromossomos autossômicos, onde observaram 27 pares bivalentes dos cromossomos A e com supranumerários exibindo bivalência, trivalência e tetraavalência. Posteriormente, Borin e Martins-Santos (2004) analisaram células meióticas em *Pimelodus sp* e *Pimelodus ortmanni* do rio Mogi Guaçu, no estado do Paraná, e confirmaram a presença de zero a dois supranumerários em metáfase I, mas não puderam confirmar se tais cromossomos eram univalentes ou bivalentes. Porto et al. (2010) identificaram pela primeira vez supranumerários em *Rinelocaria pentamaculata* do córrego Tauá, bacia do rio Paraná e, concomitantemente, estudaram seu comportamento meiótico, com a presença de 28 bivalentes em metáfases I e II, e um pequeno B univalente. Sampaio et al. (2011) analisaram seis

espécies de Curimatidae sob o aspecto mitótico e meiótico: *Cyphocharax voga*, *Cyphocharax spilodus*, *Cyphocharax saladensis*, *Cyphocharax modestus*, *Steindachnerina biornata* e *Steindachnerina insculpta* coletadas em duas bacias hidrográficas. Em *C. saladensis*, *C. spilodus* e *C. voga* observaram 27 cromossomos bivalentes em paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I, e 27 pares cromossômicos em metáfase II. Em *C. modestus*, *S. biornata* e *S. insculpta* foram observadas metáfases espermatogoniais com 54 cromossomos, paquíteno e metáfase I, com 27 bivalentes. Microcromossomos B foram observados como univalentes em metáfases espermatogoniais de *C. spilodus*, com excessão de *C. saladensis* e *S. biornata*, observados em metáfase I.

No entanto, dados sobre o comportamento meiótico de cromossomos B em peixes ainda são escassos. Araya-Jaime et al. (2015) descreveram uma técnica de análise de células meióticas em peixes teleósteos a partir de imunodeteção das proteínas do complexo sinaptonêmico. Esta técnica pode ajudar no entendimento sobre o comportamento meiótico dos cromossomos B em peixes, como recentemente utilizada por Serrano et al. (2016) em *Characidium gomesi*.

Por fim, estudos envolvendo herança, transmissão e manutenção de cromossomos B exigem muita dedicação, principalmente por se tratarem de elementos com comportamento de segregação meiótico irregular, permanecendo ainda como incógnita para os citogeneticistas de peixes. Peixes migradores e de grande porte são os mais visados para a realização de estudos sobre a herança dos supranumerários, pois há a capacidade de se trabalhar com cruzamentos dirigidos em tanques através da identificação das matrizes reprodutoras utilizando *tags* magnéticos. No entanto, normalmente há apenas uma geração filial por ano devido a biologia reprodutiva destas espécies, o que dificulta os estudos dos cromossomos B ao longo das gerações, diferente dos estudos mais avançados e conclusivos sobre cromossomos B em plantas e artrópodes, devido a maior facilidade na reprodução e obtenção de várias gerações

em curtos períodos de tempo. Portanto, muito ainda deve ser observado sobre a dinâmica dos cromossomos B em peixes para alcançarmos conclusões plausíveis sobre sua existência e permanência nos organismos hospedeiros.

### **Novas perspectivas nos estudos de cromossomos B em peixes neotropicais**

Os cromossomos B estão ranqueados entre os maiores temas de pesquisa em citogenética e biologia celular nos últimos anos. Estudos envolvendo supranumerários progrediram desde a citogenética clássica (conduzida ao longo da maior parte do século 20) e citogenética molecular (a partir de 1990 até o presente) para análise genômica e o uso de ferramentas de bioinformática nos últimos anos, devido ao advento de sequenciadores de nova geração (SNG) com um baixo custo (Valente et al., 2017).

Os estudos envolvendo a citogenética clássica e molecular foram extensivamente utilizados no entendimento dos Bs em uma tentativa de responder questões principalmente sobre a origem e evolução destes elementos genômicos. Embora estas metodologias tenham fornecido importantes descobertas elas apresentam um limite de resolução molecular. No entanto, os avanços tecnológicos em sequenciamento permitiram uma investigação massiva sobre questões estruturais e funcionais relacionadas aos cromossomos B que anteriormente não seria possível (Valente et al., 2017).

A tendência atual dos estudos envolvendo os cromossomos B está mais voltada para o conhecimento estrutural dos Bs, a partir da utilização de metodologias de SNG e também sobre a análise funcional dos supranumerários nos organismos portadores. Um estudo pioneiro sobre a estrutura de cromossomos B foi feito em centeio por Martis et al. (2012), onde utilizaram SNG nos cromossomos A e B. Estes autores identificaram que o cromossomo B apresenta extensa homologia com os cromossomos 3R e 7R, além disso, também foi

identificada que na região centromérica dos Bs contém grandes quantidades de sequências provenientes de organelas (plastídios e mitocôndrias).

Em peixes, o sequenciamento massivo do genoma foi realizado no ciclídeo africano *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al., 2014) utilizando análises de SNG com o cromossomo B microdissectado e o genoma total B+ (indivíduo portador) e B- (não portador). Este estudo mostrou que os Bs contêm milhares de sequências duplicadas de todos os cromossomos A desta espécie. Além disso, estes autores encontraram muitos genes presentes nos cromossomos B, alguns os quais estavam ainda intactos. Adicionalmente, estudos funcionais envolvendo cromossomos B em *A. latifasciata* apresentam RNAs não codificantes que podem ter um importante papel na função celular, favorecendo a manutenção dos Bs durante a segregação na divisão celular (Ramos et al., 2017).

Apesar dos avanços sobre o conhecimento estrutural e funcional dos cromossomos B em alguns organismos modelo como, por exemplo, o centeio e o ciclídeo africano, ainda não temos estudos relevantes sobre este tema para os peixes da região Neotropical.

Baseado nos dados obtidos nos estudos mais recentes sobre cromossomos B envolvendo metodologias de SNG podemos pensar que houve uma mudança na visão clássica, na qual os Bs são pobres em genes/atividade gênica, sugerindo que estes elementos genômicos podem exercer um importante papel na biologia celular, além da visão clássica de parasitismo relacionado à sua perpetuação ao longo das gerações. Portanto, podemos esperar que com os avanços nas metodologias muitas questões incompreendidas a respeito dos Bs serão elucidadas.



## Considerações gerais

A origem, manutenção e herança dos cromossomos B presentes no genoma de diversas espécies de plantas e animais são grandes incógnitas que ainda intrigam os citogeneticistas de todo mundo. Diversos estudos vêm sendo realizados, e muitas técnicas sofisticadas estão contribuindo para a elucidação deste enigma, principalmente em artrópodes e plantas. Recentemente, avanços tecnológicos em estudos cromossômicos como a microdissecção associada à FISH, clonagem e sequenciamento vêm contribuindo para o entendimento da estrutura e origem dos supranumerários. Não obstante, análises aprofundadas sobre o comportamento e manutenção destes elementos extras a nível celular alcançou uma posição de destaque perante a comunidade científica. Porém, a citogenética de peixes se ateve, principalmente, à descrição de ocorrência de cromossomos B em diferentes espécies e poucos grupos de pesquisadores nesta área buscaram estudos mais refinados sobre a existência e importância dos supranumerários em seus portadores. Diante disto, muito ainda deve ser feito para nos igualarmos aos riquíssimos dados de cromossomos B descritos para artrópodes e plantas.

Os trabalhos descritivos de supranumerários em peixes neotropicais são alicerces para grandes estudos dos cromossomos B nos diversos grupos de seres vivos. No entanto, além de descrever, torna-se necessário a busca de dados mais aprofundados concernentes à origem, manutenção, frequência de ocorrência, dinâmica evolutiva e herança.

Uma nova maneira de se abordar a questão dos supranumerários vem sendo desenvolvida entre os citogeneticistas de peixes do Neotrópico. Isto pode ser observado com os trabalhos pioneiros quanto a origem, dinâmica evolutiva e herança, desenvolvido por Voltolin et al. (2011) em *Prochilodus lineatus*, onde estes pesquisadores começaram a entender a problemática dos cromossomos B nesta espécie, baseando-se em estudos

desenvolvidos por Camacho et al. (2005) em espécies de gafanhotos. Hoje, a grande maioria dos trabalhos envolvendo supranumerários em peixes neotropicais deixam clara a necessidade de um melhor entendimento acerca de sua origem, função e evolução. Isto demonstra o interesse da comunidade científica em aprimorar seus estudos nesta linha de pesquisa. Neste sentido, outro apelo torna-se necessário. Somente a partir da inserção de cálculos da média, índice de instabilidade mitótica (MI), dados sobre a manutenção dos supranumerários, período de invasão, neutralização, regeneração e até mesmo a extinção destes elementos extras tornar-se-ão mais claros.

Mais recentemente, análises citogenômicas e genômicas de supranumerários tendem a se tornar cada vez mais frequentes devido principalmente ao acesso facilitado de sequenciadores de nova geração, que permitem sequenciamentos massivos a baixo custo e tempo relativamente baixos, fornecendo a ordem exata dos pares de bases em um determinado segmento de DNA. Este conhecimento fornece informações importantes sobre sua estrutura, função e relação evolutiva com outros genes (de um mesmo organismo ou de organismos diferentes).

Diante dos dados mencionados nesta revisão, acreditamos que os supranumerários são elementos independentes, considerados de “vida própria”. Para encontrarmos sua exata origem e significância evolutiva, devemos realizar estudos envolvendo todos os cromossomos B dos organismos portadores, mas ao mesmo tempo, teremos que saber discernir suas próprias particularidades, pois cada supranumerário é único, e a análise de um único cromossomo B não poderá responder a origem de todos os outros.

## CAPÍTULO 2

### **Estudos citogenéticos em *Prochilodus lineatus*: conservação cariotípica, distribuição e hipóteses sobre a origem dos cromossomos B**

#### **RESUMO**

A espécie de peixe *Prochilodus lineatus* apresenta um interessante sistema de cromossomos B, podendo ocorrer três tipos morfológicos: acrocêntrico, metacêntrico e submetacêntrico. No entanto, grande parte dos estudos citogenéticos nesta espécie são restritos à população natural do rio Mogi Guaçu. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a estrutura cariotípica bem como a ocorrência dos supranumerários em *P. lineatus* em várias localidades na bacia do rio Paraná, onde esta espécie é abundante. Os resultados obtidos mostraram uma macroestrutura cariotípica predominante conservada e presença de cromossomos B em todas as localidades, com exceção do rio Apa. Além disso, foram encontradas novas variantes morfológicas na população do rio Batalha (Reginópolis). Estes resultados nos permitem inferir que há uma grande ocorrência de cromossomos B nesta espécie, os quais são bastante mutáveis e que provavelmente possam ter se originado na bacia do rio Grande, se irradiando a partir desta localidade para toda a bacia do alto rio Paraná.

## Introdução

A família Prochilodontidae compreende 21 espécies de peixes distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies) (Castro e Vari 2004). Dentre os grandes migradores neotropicais podemos destacar os peixes do gênero *Prochilodus*, os quais são considerados um dos componentes mais importantes da pesca comercial e de subsistência na América do Sul (Castro e Vari, 2004), com exceção do Chile, onde estas espécies não são encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983).

Dados citogenéticos sobre peixes do gênero *Prochilodus* têm mostrado um cariótipo conservado, apresentando um número diploide composto por 54 cromossomos com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990, Voltolin et al. 2013). Diante disso, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae apresenta uma macroestrutura cariotípica predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1983, 1990).

A utilização de marcadores citogenéticos convencionais como a impregnação por nitrato de prata na identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) evidenciou em algumas espécies do gênero *Prochilodus* NOR simples em somente um par cromossômico (Pauls e Bertollo, 1990; Venere et al., 1999, Oliveira et al., 2003; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Vicari et al., 2006; Voltolin et al., 2013). Adicionalmente, análises de bandamento C foram realizadas em representantes da família Prochilodontidae e descrevem um padrão de heterocromatina constitutiva predominantes nas regiões centroméricas de todos os cromossomos A na forma de blocos bem caracterizados (Pauls e Bertollo, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Jesus e Moreira-Filho 2003; Artoni et al., 2006, Voltolin et al., 2009, 2013).

Entretanto, uma característica interessante dentro do gênero *Prochilodus* é a variação cariotípica relacionada à presença de cromossomos supranumerários. Estes cromossomos são classificados como microcromossomos devido ao tamanho reduzido em relação aos cromossomos A e até agora foram descritos em seis espécies do gênero *Prochilodus*: *Prochilodus argenteus* (Penitente et al., 2015), *Prochilodus brevis* (Pauls e Bertollo, 1990), *Prochilodus costatus* (Melo et al., 2017), *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983), *Prochilodus mariae* (Oliveira et al., 2003) e *Prochilodus nicricans* (Pauls e Bertollo, 1990; Venere et al., 1999).

Os cromossomos B foram identificados primeiramente em *P. lineatus* por Pauls e Bertollo (1983) e desde então esta espécie tem sido utilizada em muitos estudos sobre a origem, manutenção e transmissão desses elementos genômicos, podendo ser considerada uma espécie modelo nos estudos dos cromossomos supranumerários em peixes neotropicais. Esta espécie pode apresentar a ocorrência de até nove cromossomos B (Voltolin et al., 2011) e, além disso, há polimorfismo dos cromossomos B, podendo ocorrer nos tipos: acrocêntrico, metacêntrico e submetacêntrico (Artoni et al., 2006; Penitente et al., 2013, 2016ab). No entanto, a maioria dos estudos concernentes aos cromossomos B foram realizados na população do rio Mogi Guaçu, havendo uma carência de dados citogenéticos para *P. lineatus* ao longo da bacia do rio Paraná, onde esta espécie é abundante.

Apesar das características citogenéticas dos *Prochilodus* serem consideradas conservadas por muitos autores, o objetivo deste presente estudo foi realizar uma análise comparativa através do uso de marcadores citogenéticos convencionais em diferentes populações de *P. lineatus*, no intuito de mapear a frequência e distribuição dos cromossomos B ao longo da bacia do rio Paraná.

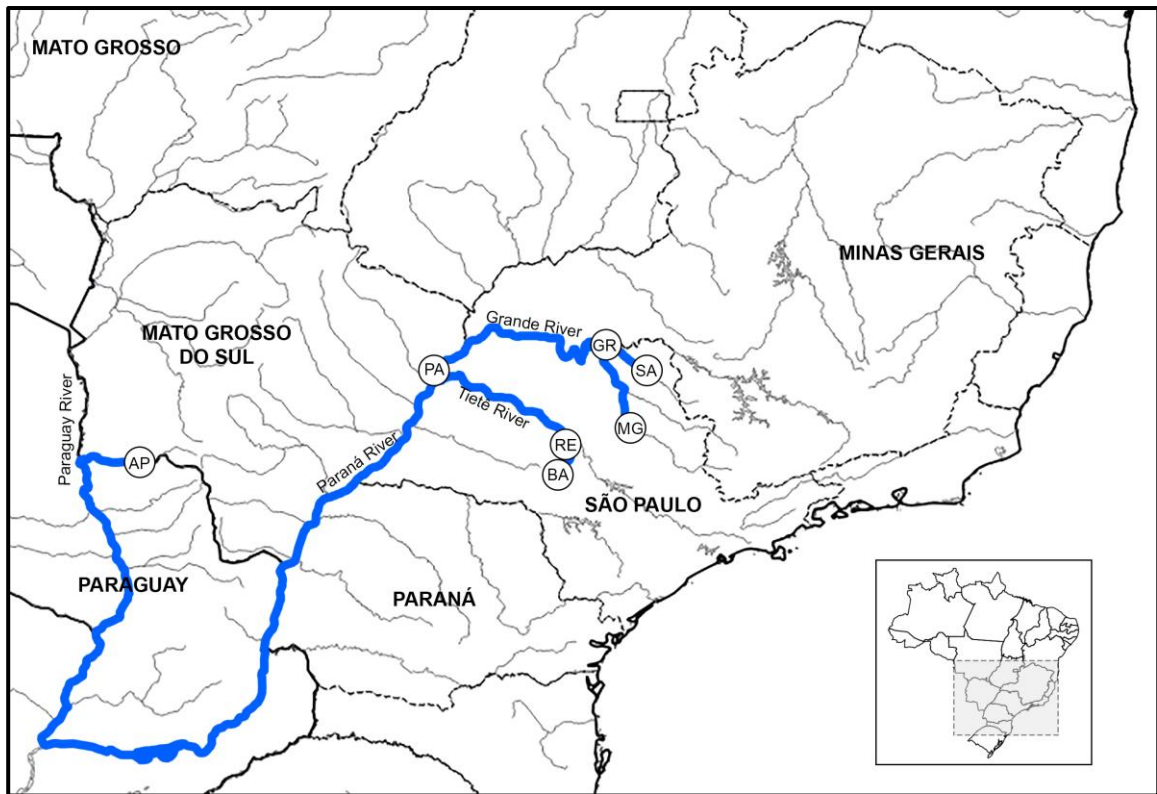
## Material e métodos

Foram amostrados um total de 148 espécimes de *P. lineatus* coletados em sete localidades na bacia do rio Paraná, sob autorização do MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO (nº de protocolo: 18884-1), e registro no IBAMA (nº 2567470). Detalhes das localidades amostradas e tamanho amostral estão descritos na Tabela 1 e Figura 1. Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelos métodos de estimulação de mitoses (Lozano et al., 1988; Oliveira et al., 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti et al., 1993), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al., 1981) e por cultura de linfócitos segundo Fenocchio e Bertollo (1988).

**Tabela 1.** Pontos de coleta de *P. lineatus* ao longo da bacia do Paraná

População	Código	N	Coordenadas geográficas
Mogi Guaçu	MG	32	-21.9267528, -47.3669111
Sapucai	SA	23	-20.5724083, -47.7827416
Grande	GR	20	-20.1258167, -48.5738056
Paraná	PA	30	-20.7767028, -51.6404721
Reginópolis	RE	15	-21.8441917, -49.2194721
Bauru	BA	8	-22.3820556, -49.1153610
Apa	AP	20	-22.2497111, -56.9268693

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foram identificadas utilizando a técnica de coloração por nitrato de prata descrita por Howell e Black (1980) e os padrões de heterocromatina constitutiva nas preparações cromossômicas foram obtidos segundo o método proposto por Sumner (1972). As imagens foram capturadas utilizando o programa cellSens Standard 1.14 (Olympus) com uma câmera digital Olympus Qcolor5 acoplada a um microscópio de fluorescência (BX50, Olympus).



**Figura 1.** Pontos de coleta de *P. lineatus* ao longo da bacia do Paraná, sendo: (AP) Apa, (PA) Paraná, (GR) Grande, (SA) Sapucaí, (MG) Mogi Guaçu, (RE) Batalha - Reginópolis, (BA) Batalha - Bauru.

Comparações entre as populações sobre a frequência de cada tipo de B (número médio de B de cada variante) foram realizados por meio de análise de variância simples (*one-way* ANOVA). Para análises estatísticas foi utilizado o programa BioEstat 5.3 (Ayres, 2007), considerando os valores de  $P < 0,05$  como estatisticamente significativos.

## Resultados

Todos os exemplares da espécie *P. lineatus* coletados nas sete localidades da bacia do rio Paraná apresentaram uma constituição cariotípica com um número diploide composto por 54 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico com número fundamental igual a 108 (Figura 2). Além disso, foi constatada uma heterogeneidade com relação à presença de

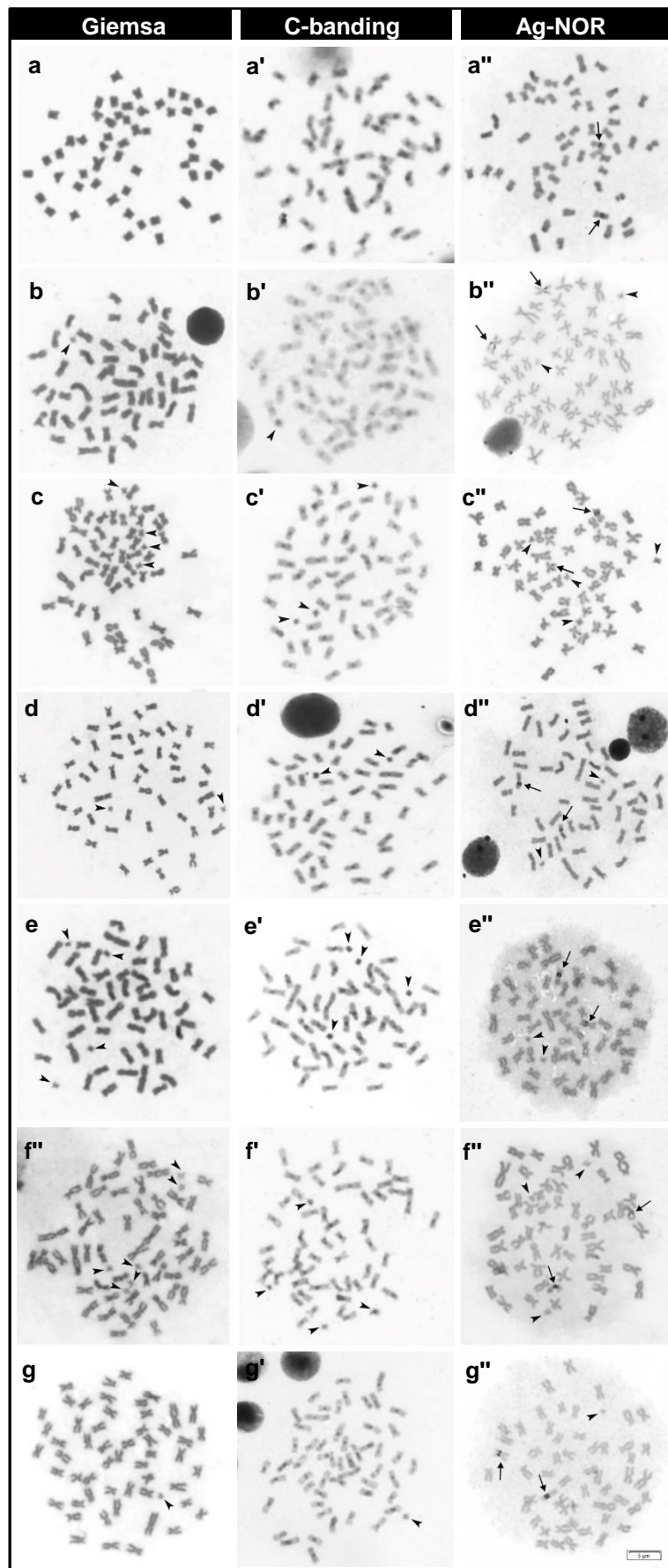
cromossomos supranumerários entre as populações de *P. lineatus* analisadas neste estudo (Figuras 2, 3, 4 e 5; Tabela 2).

No tocante à frequência dos cromossomos Bs nas localidades analisadas, apenas a população pertencente à bacia do rio Paraguai (rio Apa [AP]) não apresentou indivíduos portadores de supranumerários. Já os demais pontos se diferenciaram com relação à frequência média e ocorrência de polimorfismo nos cromossomos Bs (Tabela 2, Figuras 3, 4 e 5). Somente nas localidades contidas na bacia do rio Grande (rio Mogi Guaçu [MG], rio Sapucaí [SA] e rio Grande [GR]) ocorreram os três tipos morfológicos de cromossomos B descritos para esta espécie: acrocêntrico, metacêntrico e submetacêntrico. No rio Paraná (PA) a maioria dos tipos de cromossomos B encontrados são do tipo metacêntrico além da presença de um único indivíduo portador de um cromossomo B acrocêntrico. As localidades pertencentes a bacia do rio Tietê (rio Batalha – Bauru [BA] e rio Batalha – Reginópolis [RE]) apresentaram apenas a ocorrência do tipo metacêntrico.

Entretanto, em RE foram encontradas três novas variantes de micro cromossomos B metacêntricos, podendo ser classificadas como B<sub>1</sub> (pequeno), B<sub>2</sub> (médio) e B<sub>3</sub> (grande) (Figura 6). Além disso, o tipo metacêntrico foi o mais predominante dentre todas as variantes nas populações analisadas, inclusive as duas localidades do rio Batalha (RE e BA) apresentaram apenas este tipo morfológico. Além disso, não foi detectada variação intraindividual dos Bs em nenhum peixe portador de supranumerários.

Os resultados obtidos pela análise estatística utilizando *one-way* ANOVA entre as frequências dos diferentes tipos de Bs demonstraram uma diferenciação entre as localidades, sendo para o tipo metacêntrico:  $F = 18,1307$ ,  $P < 0,0001$  (gl = 6), submetacêntrico:  $F = 6,5932$ ,  $P < 0,0001$  (gl = 6) e acrocêntrico:  $F = 8,1826$ ,  $P < 0,0001$  (gl = 6).





**Figura 2.** Metáfases de todas as populações analisadas de *P. lineatus* coradas com Giemsa, banda C e Ag-NOR, respectivamente. As localidades são: (a) Apa, (b) Mogi Guaçu, (c) Sapucaí, (d) Batalha – Reginópolis, (e) Grande, (f) Batalha – Bauru, (g) Paraná. Cabeças de seta indicam cromossomos B e setas as regiões de NOR.

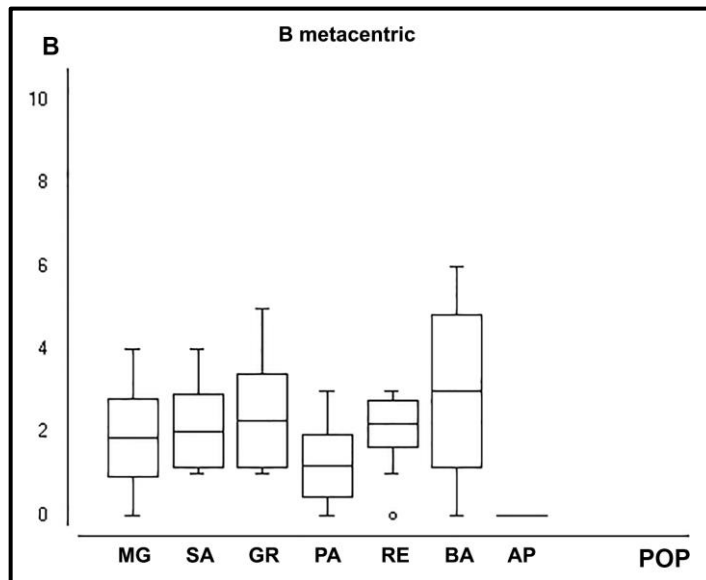


Figura 3. Frequência do B metacêntrico nas localidades.

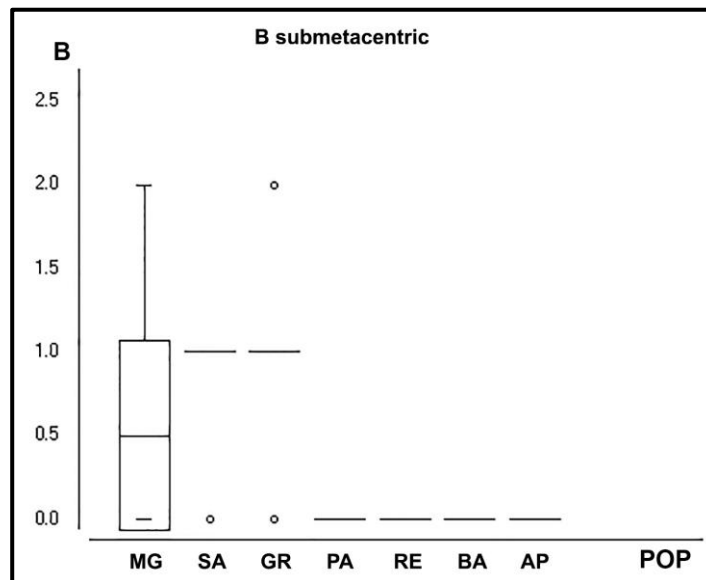


Figura 4. Frequência do B submetacêntrico nas localidades.

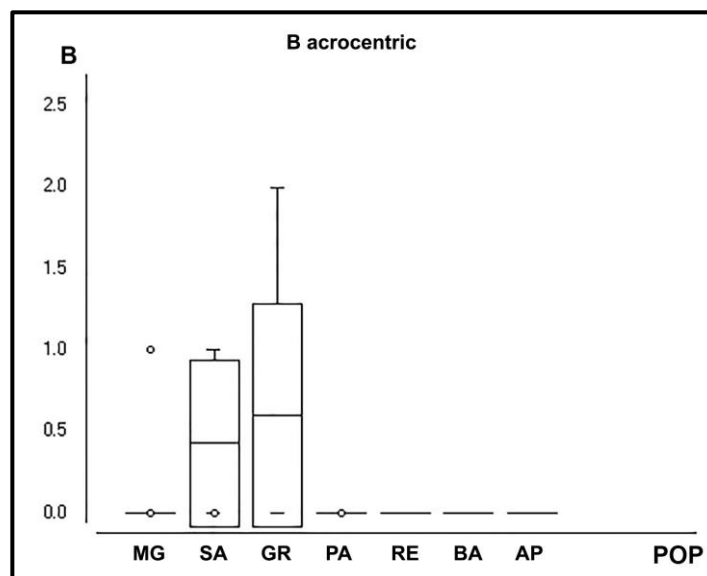


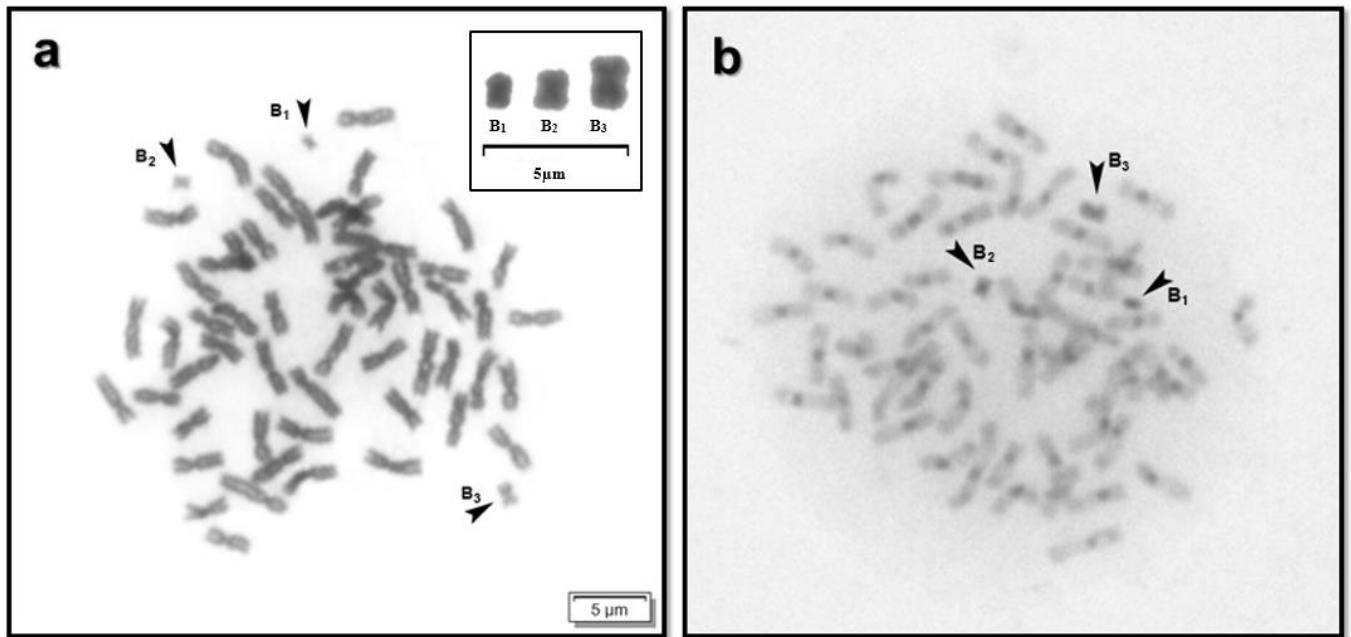
Figura 5. Frequência do B acrocêntrico nas localidades.

**Tabela 2.** Estatística descritiva dos tipos de B encontrados em *P. lineatus* nos sete pontos amostrados. SE = erro padrão.

Tipo de B		MG	SA	GR	PA	RE	BA	AP
Meta	Média	1.8750	2.0435	2.3000	1.2000	2.0667	3.0000	0.0000
	SE	0.1665	0.1831	0.2524	0.1390	0.2063	0.6547	0.0000
Submeta	Média	0.5000	0.2609	0.4500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	SE	0.1004	0.1128	0.1535	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Acro	Média	0.0625	0.3478	0.6000	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000
	SE	0.0435	0.1194	0.1522	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000

A utilização da técnica de detecção NORs pela coloração por nitrato de prata revelou marcações simples no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos em todas as localidades amostradas. Entretanto, não foram observadas marcações de NORs nos cromossomos supranumerários em todos os indivíduos portadores.

Por fim, utilizou-se a técnica de bandamento C na identificação do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva para todas as populações analisadas a qual foi possível observar blocos heterocromáticos conspícuos presentes predominantemente na região centromérica dos cromossomos dos cromossomos padrão A em todos os indivíduos (Figura 2). Além disso, todos os tipos de cromossomos supranumerários analisados apresentaram-se totalmente heterocromáticos. Os resultados apresentados quanto à localização dos blocos heterocromáticos não nos permitiram identificar diferenças entre todas as localidades analisadas neste estudo.



**Figura 6.** Novas variantes de B metacêntrico encontradas em *P. lineatus* em RE. A variante B<sub>1</sub> é a menor, B<sub>2</sub> apresenta tamanho médio e B<sub>3</sub> é a de maior tamanho. (a) Coloração com Giemsa; (b) banda C evidenciando que as três variantes são completamente heterocromáticas.

## Discussão

Estudos pioneiros realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990) sobre a citogenética de peixes do gênero *Prochilodus* sugeriram a existência de uma acentuada homogeneidade dos caracteres cariotípicos básicos. Vários trabalhos na literatura mostraram que exemplares de *Prochilodus* analisados citogeneticamente apresentaram um número diploide composto por cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho 2003, Voltolin et al., 2009, 2013). Portanto, estes dados são condizentes com os resultados obtidos neste estudo (Figura 2), sendo possível observar uma conservação da macroestrutura cariotípica neste grupo.

A técnica de banda C se mostrou muito útil nos estudos citogenéticos de peixes permitindo a identificação das regiões de heterocromatina constitutiva em muitas espécies.

Diferenças na distribuição de segmentos positivos de banda C podem auxiliar na caracterização de gêneros, espécies e populações (Montovani et al., 2000).

Vários estudos utilizando o bandamento C foram realizados na família Prochilodontidae e frequentemente os exemplares do gênero *Prochilodus* são caracterizados por apresentarem blocos heterocromáticos conspícuos geralmente nas regiões centroméricas dos cromossomos A, além disso, os Bs apresentaram-se totalmente heterocromáticos de acordo com dados já descritos por outros autores (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al. 2006; Voltolin et al., 2013).

Portanto, neste estudo observamos que o padrão de distribuição da heterocromatina no genoma de todas as populações de *P. lineatus* analisadas apresenta um padrão condizente com outros estudos citogenéticos realizados nesta espécie, tanto nos cromossomos A quanto nos Bs, não sendo possível caracterizar diferentes populações de *P. lineatus* apenas utilizando o bandamento C como marcador citogenético.

Adicionalmente, a técnica de NOR tem sido extensivamente estudada em peixes e é considerada um marcador citogenético eficiente, auxiliando nos estudos citotaxonômicos das espécies de peixes (Galetti Jr, 1998). Os exemplares de *P. lineatus* analisados apresentaram somente um par de cromossomos portador da NOR localizado no braço longo de um par de cromossomo submetacêntrico (Figura 2) conforme já descrito para esta espécie (Pauls e Bertollo, 1983,1990; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009, 2013).

Portanto, os dados obtidos na análise citogenética de bandamento C e NORs das oito populações de *P. lineatus*, provenientes da bacia do rio Paraná, reforçam a hipótese de que há uma evolução da macroestrutura cariotípica predominantemente conservada na família Prochilodontidae e, principalmente, na espécie *P. lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990).

No entanto, este conservadorismo cariotípico está restrito somente aos cromossomos A os quais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo. No presente trabalho foi possível identificar uma diversidade nas frequências dos cromossomos B entre as populações analisadas e também com relação a ocorrência de múltiplas variantes de B observadas ao longo da bacia do rio Paraná.

Neste estudo foram encontrados os três tipos de cromossomos B nas populações da bacia do rio Grande, conforme descritos primeiramente por Artoni et al. (2006) para a população do rio Mogi Guaçu, sendo o tipo metacêntrico o mais frequente. Além disso, estes autores observaram um polimorfismo com relação ao tipo metacêntrico, apresentando variações de tamanho. Adicionalmente, na população do rio Batalha (RE) foi notada uma variação no tamanho dos cromossomos B metacêntricos ainda mais acentuada que a descrita por Artoni et al. (2006) (Figura 6). Portanto, as variantes de B encontradas em *P. lineatus* podem representar formas potenciais de regenerar o polimorfismo em cada população, como foi descrito previamente por Artoni et al., (2006).

Variação em número e morfologia dos Bs é um polimorfismo cromossômico frequente encontrado em muitos organismos portadores, embora um tipo específico possa ser a forma predominante (Jones e Rees, 1982). De modo geral, os supranumerários exibem uma variação no tamanho e morfologia, além da maioria deles se apresentarem heterocromáticos com uma variação no padrão de bandamento C.

O gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* apresenta um alto polimorfismo dos cromossomos B, onde a maioria das populações são portadoras destes cromossomos adicionais (Camacho et al., 1997). Mais de 40 variantes de B têm sido descritas nas populações naturais desta espécie, de acordo com a morfologia, tamanho e padrão de heterocromatina (Henriques-Gil e Arana, 1990; López-León et al., 1993). No entanto, apenas cinco variantes são as mais frequentes nas populações (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>24</sub>), sendo os demais

tipos encontrados em baixa frequência (Henriques-Gil e Arana, 1990; López-León et al., 1993). O surgimento de novas variantes de B e a substituição de um tipo por outro pode ser causado por um mecanismo de acúmulo meiótico favorecendo uma variante sobre a outra (Zurita et al., 1998).

Adicionalmente, o padrão de distribuição dos cromossomos B e suas variantes podem servir como marcadores citogenéticos para complementar com os marcadores citogenéticos clássicos na identificação de processos evolutivos mais recentes, pois os resultados encontrados neste estudo revelam uma marcante divisão geográfica de acordo com a distribuição dos Bs em *P. lineatus*. Além disso, estes dados nos permitem inferir que a ausência de Bs em uma população desta espécie pode ser considerada uma condição rara.

Os resultados sobre a frequência das variantes dos cromossomos B nos permite levantar hipóteses sobre a origem dos Bs em *P. lineatus*, onde provavelmente se originaram na bacia do rio Grande, devido à presença de uma maior quantidade de variantes, indicando que os cromossomos B nesta localidade já percorreram um longo caminho evolutivo, dando origem a muitos tipos morfológicos distintos. Nas demais populações o tipo metacêntrico é predominante, no entanto, já podemos observar o início do surgimento de novas variantes de B como ocorre atualmente na população RE.

Além disso, a hipótese sobre o surgimento dos cromossomos B na bacia do rio Grande pode explicar a falta de cromossomos B na população do rio Apa devido a barreira geográfica do salto de Sete Quedas. Esta barreira natural isolou por um longo período de tempo as ictiofaunas do alto e baixo Paraná. Este isolamento deixou de existir depois da construção da usina hidroelétrica de Itaipu (1982) e o canal da piracema (2002). Portanto é possível que, em pouco tempo, alguns indivíduos possam transmitir cromossomos B para populações onde não ocorrem, devido ao comportamento biológico desta espécie de realizar grandes migrações reprodutivas (Sverlij et al., 1993).

Por fim, também fica evidente que algumas populações de *P. lineatus* estão isoladas umas das outras, devido ao conjunto diferenciado dos cromossomos B e a variação na frequência, revelando uma evolução independente dos Bs bem como uma origem ancestral destes cromossomos na bacia do rio Grande.



### CAPÍTULO 3

#### **Estrutura populacional em *Prochilodus lineatus*: uma nova abordagem utilizando cromossomos B e marcadores moleculares**

#### **RESUMO**

*P. lineatus* é uma das espécies migradoras mais abundantes na bacia do rio Paraná. Uma característica interessante nesta espécie é a ocorrência de um sistema de cromossomos B, que são classificados como microcromossomos, podendo ser encontrados em três tipos morfológicos (acro, meta, submetacêntrico). O presente trabalho teve como objetivo mapear a ocorrência dos cromossomos B em sete localidades ao longo da bacia do rio Paraná e utilizá-los em uma análise populacional juntamente com marcadores moleculares de DNA mitocondrial (sequenciamento da região controle) e nuclear (microsatélites). Os resultados a partir da análise com os marcadores moleculares não evidenciaram uma estruturação populacional. No entanto, com os Bs foi possível observar uma clara estruturação e também nos forneceu subsídios para levantar hipóteses sobre a origem dos supranumerários nesta espécie, a qual possivelmente se deu origem na bacia do rio Grande, devido a maior frequência e variedade de tipos. Além disso, é possível que ao longo das gerações os Bs possam colonizar as populações na porção do baixo rio Paraná que ainda não há a ocorrência destes elementos genômicos.

## **Introdução**

Testar hipóteses sobre a estrutura populacional em peixes pode ser extremamente desafiador em espécies migradoras. Esse problema ocorre porque estes animais vivem por muitos anos e exibem um comportamento migratório sazonal, podendo pertencer a estoques genéticos distintos que se sobrepõem espacialmente ao longo do ano, o que pode resultar em padrões discordantes na análise da estrutura populacional ao longo do tempo (Rueda et al., 2013).

Adicionalmente, o comportamento migratório de peixes de grande porte pode efetivamente formar uma única população panmítica em vastas áreas, tornando estas espécies como excelentes indicadores biológicos para rastrear a história de interconexão nas maiores drenagens da América do Sul (Sivasundar et al., 2001). Apesar disso, identificar a mistura (ou não) de distintos acervos genéticos convergentes na mesma área é importante para o manejo e conservação, mas requer eficientes marcadores genéticos e abordagens estatísticas (Gauthier et al., 2013).

Dentre os grandes peixes migratórios Neotropicais podemos destacar a família Prochilodontidae, a qual é considerada um dos componentes mais importantes para o comércio e pesca de subsistência de águas continentais da América do Sul, com exceção do Chile, onde estas espécies não são encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983). Populações de prochilodontídeos são numerosas e alimentam-se de detritos, algas e microrganismos (Bowen 1983, Bowen e Bonetto, 1984), portanto os membros desta família são uma conexão importante entre a transferência de energia e biomassa nas cadeias alimentares ribeirinhas (Winemiller, 1996). O ciclo de vida destes peixes inclui migrações com o propósito alimentar e reprodutivo (Barbarino Duque et al., 1998).

*Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1837) pertence a família Prochilodontidae e é a espécie de peixe mais abundante na bacia do rio Paraná em termos de biomassa absoluta (Sverlij et al., 1993). Peixes desta espécie são excelentes migradores e grandes cardumes realizam extensas migrações nos rios da bacia do Paraná durante a estação reprodutiva. Padrões migratórios de *P. lineatus* foram descritos nesta região baseados em experimentos envolvendo marcação e recaptura, biotelemetria, uso de *tags* e análise de tecidos rígidos, como os otólitos (Bayley, 1973; Lucas et al., 2001; Godinho e Kynard, 2006; Peixer e Petrere Júnior, 2009). Uma revisão de dados de marcação e recaptura nesta espécie sugeriu que extensas migrações podem ocorrer, documentando espécimes recapturados em uma distância de até 1.000 km do local de marcação (Sverlij et al., 1993).

Estudos populacionais foram conduzidos em *P. lineatus*, utilizando diferentes marcadores moleculares (alozimas, sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial, RAPDs, PCR-RFLP e microssatélites) em várias localidades ao longo da bacia do Paraná (Revaldaves et al. 1997, 2016; Sivasundar et al., 2001, Garcez et al., 2011, Ferreira et al. 2017). Entretanto, todos os estudos reportaram altos níveis de variabilidade genética sem a ocorrência de uma forte estruturação populacional ao longo da bacia do Paraná. Este padrão surge devido ao comportamento migratório desta espécie elevando assim o fluxo gênico, o qual age como um agente homogeneizador de diferentes acervos genéticos e leva a formação de uma única unidade populacional panmítica ao longo da bacia do rio Paraná (Sivasundar et al., 2001).

Uma característica interessante em algumas espécies do gênero *Prochilodus* é a abundante presença de cromossomos B (também conhecidos como supranumerários ou Bs), os quais foram descritos primeiramente em *P. lineatus* por Pauls e Bertollo (1983). Os Bs nesta espécie são encontrados na forma de microcromossomos devido apresentarem tamanho reduzido em relação aos cromossomos padrão da espécie (também chamados de cromossomos

A) de onde se pressupõe eles terem derivado (Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006; Penitente et al., 2016a).

Os supranumerários são encontrados em todos os filios dos eucariotos, são normalmente heterocromáticos e, portanto, não essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal dos organismos portadores (Jones e Rees, 1982; Jones, 1991). Adicionalmente, o padrão de transmissão e mecanismos de acúmulo (também conhecido como *drive*) não obedecem às leis mendelianas da segregação (Houben, 2017). Entretanto, a frequência dos Bs em *P. lineatus* pode variar de zero a nove (Voltolin et al., 2009), além de não apresentar variação intraindividual em suas células somáticas (Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 1997; Voltolin et al., 2010b). Os cromossomos B nesta espécie apresentam alto polimorfismo, sendo encontrados três variantes morfológicas distintas (acrocêntrica, metacêntrica e submetacêntrica, ver em Artoni, et al., 2006; Penitente et al., 2016ab).

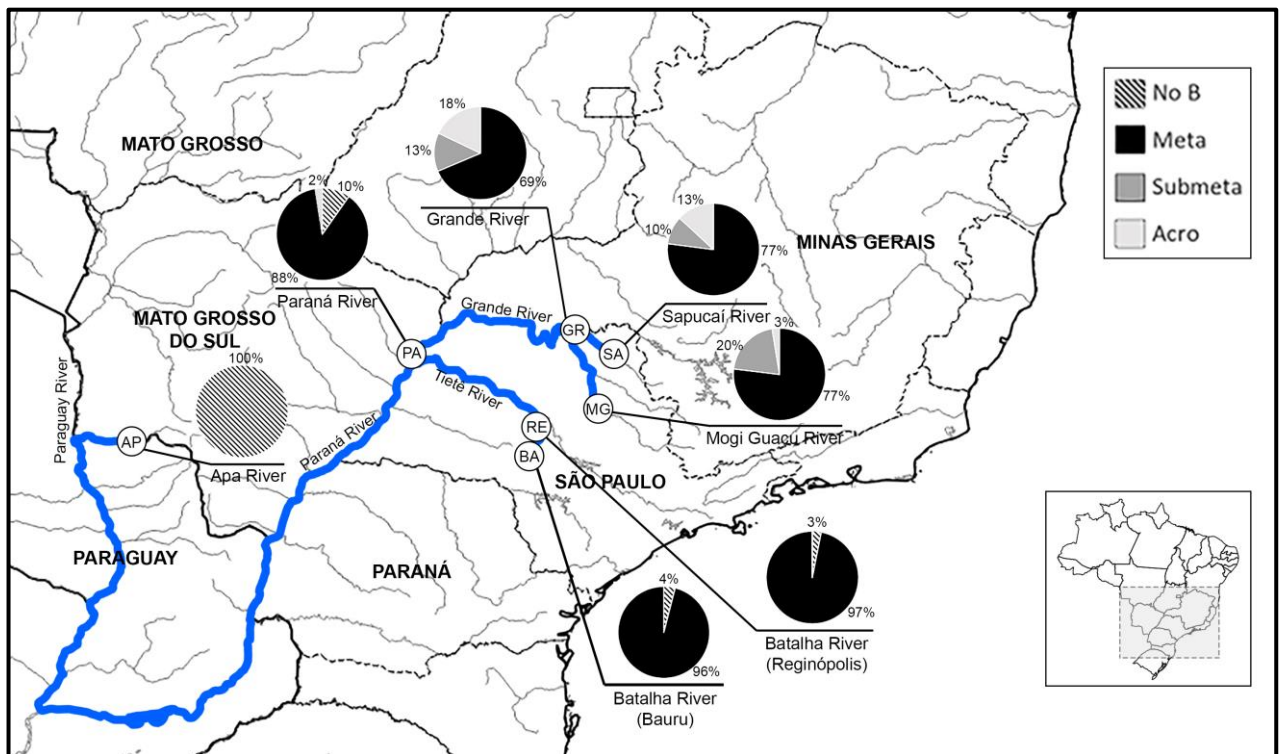
No presente estudo foi caracterizada com detalhes a distribuição dos cromossomos B em *P. lineatus* ao longo da bacia do rio Paraná. O objetivo deste estudo foi avançar no conhecimento dos mecanismos envolvendo a grande variação de Bs encontrada nesta espécie para obter algumas evidências sobre a origem temporal e espacial destes elementos genômicos.

Além disso, estudos populacionais previamente realizados nesta espécie não indicaram uma clara estruturação populacional, indicando uma possível panmixia em *P. lineatus*, mesmo entre localidades muito distantes. A dificuldade de realizar análises genético-populacionais nesta espécie pode estar ligada ao comportamento biológico reprodutivo de realizar grandes migrações. Portanto, neste estudo propomos pela primeira vez a utilização dos cromossomos B como marcadores populacionais para averiguar a estruturação populacional em espécies portadoras, além de comparar os dados com marcadores populacionais comumente utilizados, como os microssatélites e DNA mitocondrial.

## Material e Métodos

### Amostragem

Um total de 148 espécimes de *P. lineatus* foram coletados entre 2014 e 2017 em sete localidades em rios localizados na bacia do rio Paraná (Mogi Guaçu, Sapucaí, Grande, Paraná, Apa, e Batalha nas regiões de Reginópolis e Bauru, ver Figura 1 e Tabela 1), sob autorização do MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO (nº de protocolo: 18884-1), e registro no IBAMA (nº 2567470).



**Figura 1.** Pontos de coleta com a frequência de cada variante de cromossomos B.

Os procedimentos de amostragem, coleta animal e análises foram conduzidos de acordo com os protocolos seguidos pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP). Os animais foram morfologicamente identificados e armazenados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes – Unesp (Bauru, SP). O DNA genômico foi

isolado a partir de tecidos de nadadeiras fixados em etanol, seguindo as recomendações do protocolo comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega).

**Tabela 1.** Pontos de amostragem, códigos populacionais, número de espécimes coletados (N) e coordenadas geográficas.

Localidade	Código	Bacia Hidrográfica	N	Coordenadas geográficas
Mogi Guaçu	MG	Grande	32	21°55'31.90"S, 47°22'07.90"O
Sapucaí	SA	Grande	23	20°34'20.67"S, 47°46'57.87"O
Grande	GR	Grande	20	20°7'32.94"S, 48°34'25.70"O
Paraná	PA	Paraná	30	20°46'45.41"S, 51°38'26.44"O
Reginópolis	RE	Tietê	15	21°50'39.09"S, 49°13'10.10"O
Bauru	BA	Tietê	8	22°22'55.40"S, 49°06'55.30"O
Apa	AP	Paraguai	20	22°14'58.96" S, 56°55'36.73"O

#### mtDNA região controle

O fragmento completo do DNA mitocondrial (mtDNA) região controle foi amplificado via *Polimerase Chain Reaction* (PCR) em oito amostras de cada população, exceto para as localidades MG (N = 7) e AP (N = 6). O mtDNA foi amplificado utilizando 0,4 µM dos *primers* F-TTF e F-12R (Sivasundar et al., 2001), 150ng de DNA molde, 1,25 unidades de Taq polimerase (Applied Biosystems), 1X PCR Buffer sem MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 de mM de cada dNTP. Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: um período de incubação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1min e um tempo adicional de extensão de 5 min a 72°C. As amostras foram sequenciadas utilizando o *primer* F-12R e o *primer* interno adicional CR1 (5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG) utilizando o conjunto de sequenciamento “BigDye Terminator ver. 3.1” (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), seguindo as recomendações da fabricante.

As regiões variáveis foram checadas manualmente utilizando o programa Seqscape 2.5 (Applied Biosystems), utilizando como referência a sequência completa do genoma

mitocondrial de *P. lineatus* (nº de acesso GenBank KM245045, ver em Carmo et al., 2014). As sequências obtidas foram alinhadas com o módulo ClustalW (Thompson et al., 1997) no programa BioEdit v.7.2.6 (Hall, 1999). Os haplótipos foram detectados pelo programa DnaSP 5.10 (Librado e Rozas, 2009). Além disso, foi utilizado o jModelTest (Santorum et al., 2014) para averiguar qual modelo de substituição nucleotídica seria o mais adequado para esta região, o qual mostrou ser HKY + I + G (*gamma shape* = 0,507) o mais adequado para os dados obtidos. No entanto, o modelo correspondente ao HKY + I + G no programa Arlequin 3.1 e utilizado neste estudo foi o modelo de Tamura (Tamura, 1992).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada no estudo de variação genética entre as populações, grupos de populações e dentro de populações utilizando Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) com 1.000 permutações. As amostras foram separadas em quatro grupos, com um compreendendo a bacia do rio Grande (MG, SA e GR), outro grupo da bacia do Tietê (RE e BA) e dois grupos isolados (PA e AP). A diversidade haplotípica (*h*), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), comparação populacional utilizando o modelo de Tamura e índice de diferenciação populacional ( $\Phi_{ST}$ ) foram estimados utilizando também o programa Arlequin 3.1. Todas as sequências dos haplótipos foram depositadas no GenBank (número de acesso: MF536758 - MF536800).

Uma rede de haplótipos de *median-joining* foi construída no programa NETWORK v.5.0.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). Além disso, também foi construída uma árvore de *neighbor-joining* a partir da matriz de dados de  $\Phi_{ST}$ . A árvore foi visualizada pelo programa TreeView 3.2 (Page, 1996). O teste de isolamento por distância (IPD) foi conduzido utilizando valores de  $\Phi_{ST}$  com a distância geográfica pelo teste de Mantel no programa NTSYS (Rohlf, 1993) com 10.000 permutações. Os níveis de significância ( $P < 0,05$ ) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Loci de microssatélites

Cada indivíduo foi genotipado para 6 *loci* de microssatélites (PL03, PL14, PL34, PL64, PL139, PL190), seguindo os procedimentos previamente descritos por Rueda et al. (2011). Os fragmentos de microssatélites foram classificados de acordo com o tamanho em um sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), utilizando LIZ500 como padrão de referência dos fragmentos. Os indivíduos foram genotipados de acordo com as classes alélicas utilizando o programa GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

Alelos nulos e erros de genotipagem foram avaliados com o programa Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). As frequências alélicas, diversidade genética entre populações e riqueza alélica foram estimadas utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Os valores de  $F_{IS}$ , desvio de Hardy–Weinberg para todos os *loci* foram estimados pelo programa GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008). O valor de  $F_{ST}$  entre as populações também foi estimado com o GENEPOP 4.0 utilizando 10.000 permutações.

O teste de AMOVA foi realizado no estudo de variação genética entre as populações, grupos de populações e dentro de populações utilizando Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) com 1.000 permutações. As amostras foram separadas em quatro grupos, com um compreendendo a bacia do rio Grande (MG, SA e GR), outro grupo da bacia do Tietê (RE e BA) e dois grupos isolados (PA e AP).

Análises Bayesianas foram realizadas neste estudo através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para averiguar o real número de populações (K). Foi utilizado “*no admixture model*” para permitir uma máxima resolução, porque este parâmetro assume que cada indivíduo pode ser proveniente de cada população (K), sendo mais indicado para verificar uma pequena estruturação populacional (Pritchard et al., 2000). Os parâmetros utilizados foram alelos correlacionados, 5 réplicas de cada valor de K, 500.000 gerações de



Markov *chain* Monte Carlo (MCMC), com tempos de *burn-in* de 200.000, assumindo valores de  $K = 1$  até 8.

Adicionalmente, os dados de microssatélites foram usados para averiguar a ocorrência de possíveis *bottlenecks* recentes nas populações estudadas utilizando o programa Bottleneck v.1.2.02 (Piry et al. 1999). Nesta análise foi utilizado o “*Infinite Alleles Model*” (IAM), “*Two-Phase Model*” (TPM com 70 % de SMM e 30 % de IAM) e “*Stepwise Mutation Model*” (SMM).

Além disso, foi construída uma árvore de *neighbor-joining* a partir da matriz de distâncias genéticas de Nei entre todas as populações (Da; Nei, 1987) utilizando o programa POPULATIONS 1.2.26 (Langella, 2002). A robustez dos ramos foi testada com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Também foi realizada uma análise de DAPC (*Discriminant Analysis of Principal Components*) (Jombart et al., 2010), a qual consiste em um método multivariado para identificar e descrever grupos de indivíduos geneticamente correlacionados. Os níveis de significância ( $P < 0,05$ ) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989). Por fim foi realizado o teste de isolamento por distância a partir do teste de Mantel no programa NTSYS (Rohlf, 1993) com 10.000 permutações.

#### Análise dos cromossomos B

Devido à falta de marcadores moleculares para a detecção de cromossomos B em *P. lineatus*, uma exaustiva análise citogenética se fez necessária. A análise citogenética dos exemplares foi conduzida utilizando o método tradicional *in vivo* (Foresti et al., 1981) para obtenção de cromossomos metafásicos, método *in vitro* (Foresti et al. 1993) e a técnica de cultura de linfócitos, conforme descrita por Fenocchio e Bertollo (1988) com alguns ajustes. Apenas coloração convencional com Giemsa foi utilizada, devido à facilidade para a

identificação dos supranumerários nesta espécie, pois ocorrem na forma de microcromossomos, ou seja, são bem menores que os cromossomos A.

A análise populacional envolvendo os cromossomos B como marcadores foi conduzida a partir dos dados da frequência de cada variante de B encontrada nesta espécie (metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntrico) em todas as localidades estudadas citogeneticamente. Cada tipo de cromossomo B foi considerado como um *locus* e a frequência de cada tipo como sendo seus alelos, de acordo com o modelo proposto por Castro et al. (2001) em uma análise populacional envolvendo polimorfismo de NORs em trutas.

Os valores de diferenciação populacional ( $F_{ST}$ ) entre as localidades foram estimados utilizando o programa GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008). Foram construídas árvores de *neighbor-joining* a partir dos valores de  $F_{ST}$  e da distância genética ( $D_a$ ) de Nei (Nei, 1987) entre as localidades. As árvores foram visualizadas utilizando o programa TreeView 3.2 (Page, 1996). O teste de isolamento por distância foi conduzido a partir dos valores de  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$  (Rousset, 1997) com a distância geográfica no teste de Mantel, utilizando o programa NTSYS (Rohlf, 1993) com 10.000 permutações. Por fim, foi realizada análise de DAPC (Jombart et al., 2010) utilizando as frequências dos cromossomos B. Os valores de significância ( $P < 0,05$ ) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

## Resultados

### mtDNA região controle

A partir do sequenciamento da região controle foram obtidos 43 haplótipos diferentes dentre os 53 exemplares analisados com um tamanho de 1.115 pares de base (pb). A diversidade de haplótipos variou de  $h = 0.8214$  (PA) para  $h = 1,000$  (MG, AS, GR, BA, AP),

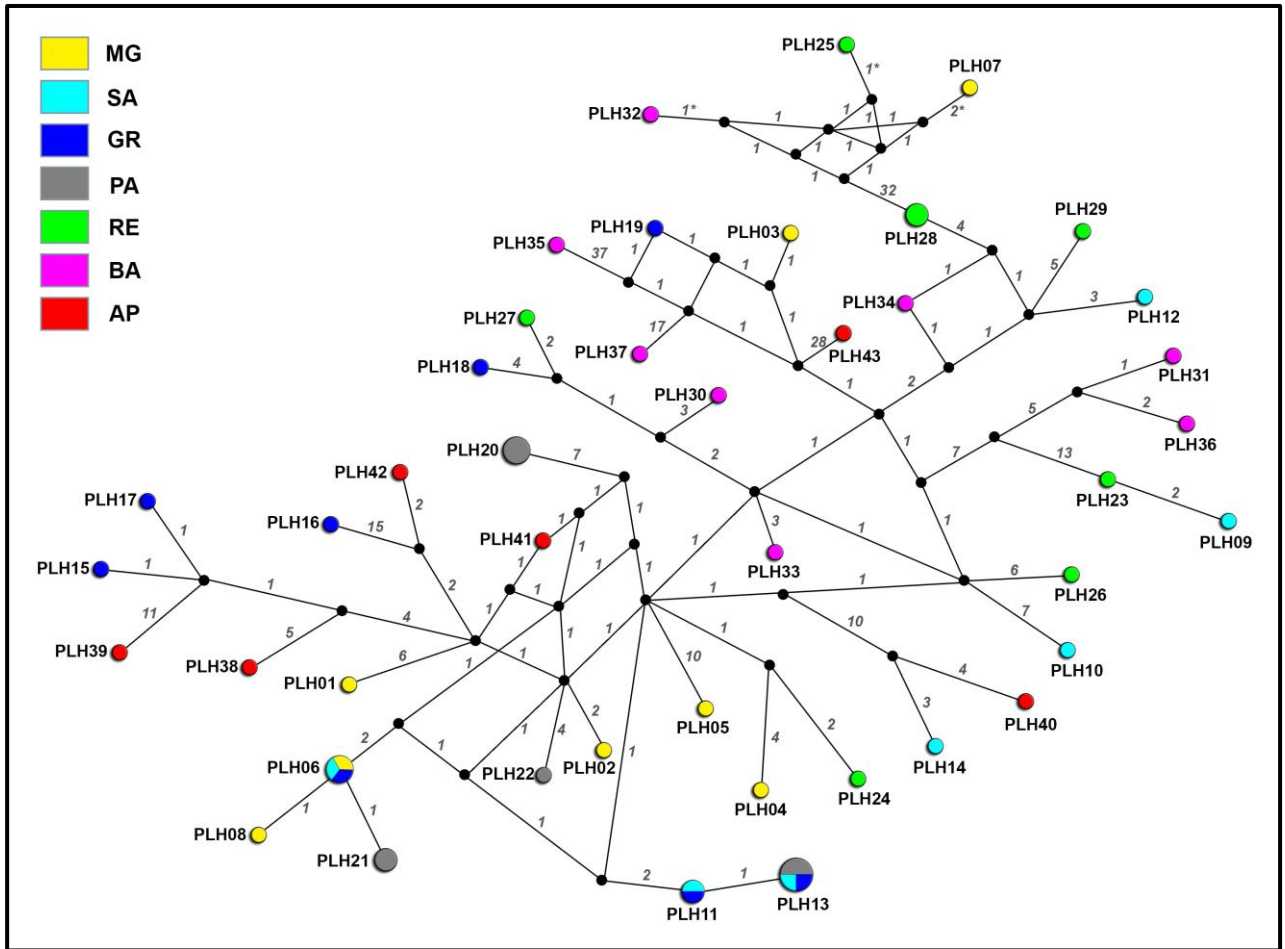
enquanto que a diversidade nucleotídica variou de  $\pi = 0,0084$  (PA) para  $\pi = 0,0223$  (BA) (Tabela 2). Uma complexa rede de haplótipos foi construída a partir do elevado número de haplótipos encontrados nas populações analisadas (Figura 2).

**Tabela 2.** Diversidade genética de *P. lineatus* encontrada em todas as localidades a partir da análise de mtDNA da região controle

População	mtDNA			
	<i>N</i>	<i>Nh</i>	<i>h</i>	$\pi$
MG	7	7	1,0000	0,0123
SA	8	8	1,0000	0,0149
GR	8	8	1,0000	0,0113
PA	8	4	0,8214	0,0084
RE	8	7	0,9643	0,0137
BA	8	8	1,0000	0,0223
AP	6	6	1,0000	0,0215

*N* = número de indivíduos, *Nh* = número de haplótipos, *h* = diversidade de haplótipos,  $\pi$  = diversidade nucleotídica.

Os valores de  $\Phi_{ST}$  variaram desde -0,0084 (MG-SA) a 0,2433 (PA-RE), mostrando diferenças significativas entre MG-RE, GR-RE, PA-RE, MG-BA, GR-BA, PA-BA, PA-AP, RE-AP após realizada análise estatística ( $P < 0.05$ ) (Tabela 3). Adicionalmente, foram encontradas duplicações na região controle, nos haplótipos PLH07, PLH25 e PLH32. A duplicação do haplótipo PLH7 apresenta 67pb com duas regiões duplicadas *in tandem*, já nos haplótipos PLH25 e PLH32 estas regiões tem o tamanho, respectivamente, de 36 e 34pb, com 8 e 3 bases diferentes de PLH07.



**Figura 2.** Rede de haplótipos da região controle do mtDNA construída a partir do método *median-joining*. Os haplótipos na imagem estão descritos desde PLH01 até PLH43. Os círculos negros representam os vetores médios necessários para conectar todos os haplótipos observados. Os números em itálico indicam o número de mutações pontuais. O tamanho dos círculos está relacionado com a abundância de cada haplótipo nas localidades analisadas. (\*) significa uma duplicação na região controle.

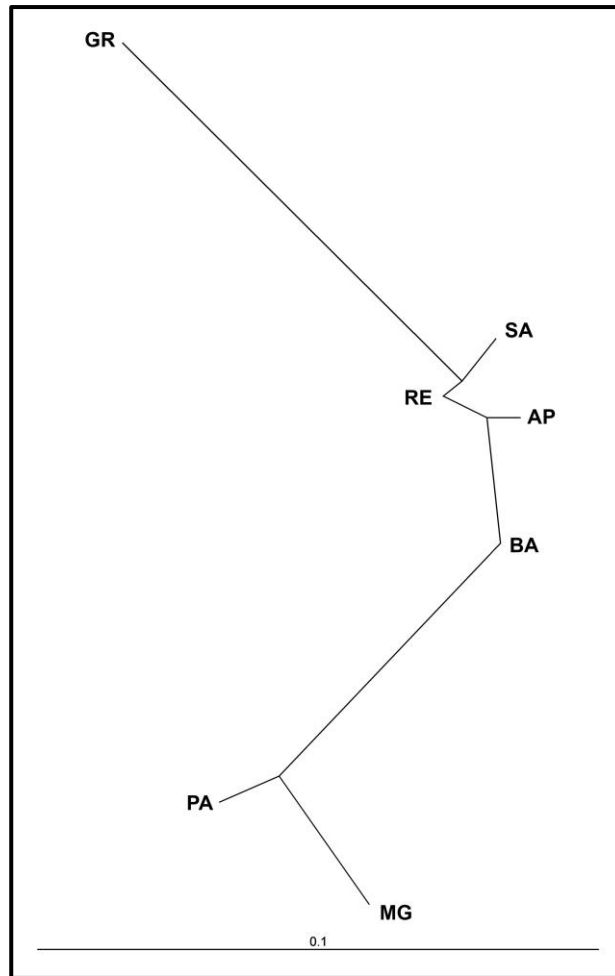
A análise de AMOVA revelou uma variação de 8,85% entre grupos e 90,58% entre populações, ambos estatisticamente significativos ( $P = 0,0039$  e  $P = 0$ , respectivamente) (Tabela 4). A variação obtida dentro das populações foi baixa, mas significativa (0,58%,  $P = 0,0027$ ). O resultado do teste de isolamento por distância não foi significativo (teste de Mantel, 10.000 permutações:  $r = -0,2115$ ,  $P = 0,2629$ ). O dendrograma construído a partir dos valores de  $\Phi_{ST}$  mostraram três grupos relacionados: PA-MG, BA-RE-AP-SA e GR (Figura 3).

**Tabela 3.** Na matriz superior são descritos os valores  $F_{ST}$  e as distâncias  $D_a$  (parênteses) dos dados dos cromossomos B. Na matriz inferior estão os valores de  $F_{ST}$  obtidos a partir de análise de microssatélites e  $\Phi_{ST}$  para região controle mtDNA (parênteses). Os valores em negrito indicam que se diferenciam estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

	MG	SA	GR	PA	RE	BA	AP
<b>MG</b>	-----	0,0805 (0,0525)	0,1101 (0,0810)	0,1465 (0,1236)	0,1370 (0,3563)	0,1110 (0,2181)	0,3165 (0,3755)
<b>SA</b>	-0,0005 (-0,0084)	-----	0,0034 (0,0221)	0,1431 (0,1266)	0,0990 (0,3243)	0,0894 (0,2326)	0,3337 (0,4269)
<b>GR</b>	0,0043 (-0,0178)	-0,0005 (-0,0268)	-----	0,2426 (0,2007)	0,1889 (0,3733)	0,1442 (0,2725)	0,4161 (0,4955)
<b>PA</b>	<b>0,0208</b> (0,1025)	<b>0,0129</b> (0,0695)	<b>0,0157</b> (0,0776)	-----	0,0599 (0,2940)	0,0581 (0,1623)	0,1865 (0,2026)
<b>RE</b>	0,0089 <b>(0,1020)</b>	0,0068 (0,0364)	0,0073 <b>(0,1206)</b>	<b>0,0128</b> <b>(0,2433)</b>	-----	0,0098 (0,2963)	0,2383 (0,4749)
<b>BA</b>	-0,0003 <b>(0,0982)</b>	-0,0008 (0,0553)	-0,0018 <b>(0,0974)</b>	0,0141 <b>(0,2166)</b>	0,0092 (0,0391)	-----	0,2250 (0,2154)
<b>AP</b>	0,0091 (0,0379)	0,0035 (0,0228)	0,0046 (0,0120)	<b>0,0241</b> <b>(0,0956)</b>	0,0212 <b>(0,1115)</b>	-0,0011 (0,0539)	-----

**Tabela 4.** AMOVA dos dados de microssatélites e mtDNA

Fonte de variação	Estatísticas F	% de variação	Valor P
Entre grupos	$F_{CT} = 0,0099$	0,99	0,0107
	$\Phi_{CT} = 0,0884$	8,85	0,0039
Entre populações	$F_{SC} = 0,0051$	0,50	0,3314
	$\Phi_{SC} = 0,0063$	0,58	0,0068
Dentro das populações	$F_{ST} = 0,0150$	98,50	0,0009
	$\Phi_{ST} = 0,0943$	90,58	0,0000



**Figura 3.** Dendrograma feito a partir dos dados de  $\Phi_{ST}$

### Microsatélites

Considerando todas as populações e *loci* juntos nós observamos uma média de 11,881 alelos por *locus* (total de 129 alelos), riqueza alélica média de 7,837, valores médios de  $H_o$  e  $H_e$  de 0,7302 e 0,8234, respectivamente. O microsatélite PL03 foi o menos variável, com uma média de 7 alelos e  $H_e$  média de 0,665 (Tabela 5). O *locus* PL139 apresentou o maior número de alelos ( $A = 30$ ) e também a maior  $H_e$  (0,953). Além disso, foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg envolvendo todos os *loci* em quatro localidades (MG, SA, PA e AP,  $P < 0,001$ , Tabela 5).

Na população MG foi encontrado o maior número de alelos ( $A = 89$ ), já SA apresentou os valores mais altos de riqueza alélica e  $H_e$  (8,2415 e 0,8432, respectivamente).

A localidade BA apresentou o menor número de alelos ( $A = 45$ ) e  $H_e$  média (0,7857). A população PA foi encontrada a menor riqueza alélica ( $A_r = 7,3322$ ), entretanto, a  $H_e$  foi a segunda maior entre todas as populações analisadas (0,8367). Além disso, os exemplares de PA apresentaram o maior valor de  $F_{IS}$  (0,2236).

A análise com o programa Micro-Checker indicou um excesso de homozigotos e possíveis alelos nulos para dois loci em MG (PL03 e PL34), um em SA (PL03), três em PA (PL03, PL64 e PL139) e dois em AP (PL03 e PL139). O teste de AMOVA revelaram uma variação de 0,99% entre grupos e 98,50% entre populações, ambos estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). A variação entre populações dentro de grupos foi baixa e não significativa (0,50%,  $P = 0,3314$ ) (Tabela 4). Os valores de  $F_{ST}$  entre as populações de *P. lineatus* apresentaram valores de 0 até 0,0241 (Tabela 3). Adicionalmente, a população PA é a única que se difere das demais ( $P < 0,05$ ), exceto pela localidade BA. Estes dados são consistentes com as análises de DAPC, a qual evidenciou um grupo diferenciado envolvendo exemplares da população PA com relação as demais localidades (Figura 4). Não foi detectado nenhum *bottleneck* recente a partir da análise utilizando os dados de microssatélites. Todas as amostras mostraram uma distribuição em formato de L, o que significa que não há indícios de *bottlenecks* recentes nas populações analisadas.

O teste com o programa Structure indicou  $K = 1$ , portanto, não foi constatada divisão populacional em grupos distintos. O resultado do teste de isolamento por distância não foi significativo (teste de Mantel, 10.000 permutações:  $r = 0,0644$ ,  $P = 0,5719$ ). Por fim, o dendrograma construído a partir dos valores de  $F_{ST}$  mostrou 4 grupos relacionados: AP-SA, GR-MG, PA-RE e BA (Figura 5).

**Tabela 5.** Variabilidade genética de 6 loci de microssatélites para sete populações de *P. lineatus*.

<b>Locus</b>	<b>MG</b>	<b>SA</b>	<b>GR</b>	<b>PA</b>	<b>RE</b>	<b>BA</b>	<b>AP</b>
<b>PL139</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	24	21	20	16	20	13	22
<i>Ar</i>	11,784	11,201	11,891	8,580	12,828	13,000	12,490
<i>Ho</i>	1,0000	0,9130	0,9000	0,4333	1,0000	1,0000	0,8500
<i>He</i>	0,9561	0,9437	0,9605	0,9011	0,9690	0,9732	0,9697
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0,0459	0,0325	0,0630	0,5191	-0,0319	-0,0275	0,1235
<i>EHW</i>	1,0000	0,6417	0,1860	0,0000	1,0000	1,0000	0,0680
<b>PL14</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	10	14	13	12	7	7	10
<i>Ar</i>	5,419	8,139	8,454	7,291	5,491	7,000	6,579
<i>Ho</i>	0,6563	0,7826	0,7500	0,8333	0,6667	0,7500	0,7000
<i>He</i>	0,6270	0,8251	0,8737	0,8144	0,7595	0,6875	0,7842
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0,0466	0,0515	0,1416	-0,0233	0,1223	-0,0909	0,1074
<i>EHW</i>	0,8276	0,2981	0,0177	0,2308	0,2049	0,6367	0,2629
<b>PL190</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	13	10	11	10	7	7	11
<i>Ar</i>	8,116	6,323	7,267	5,731	5,935	7,000	7,521
<i>Ho</i>	0,8438	0,8261	0,8000	0,6667	0,8000	0,7500	0,8000
<i>He</i>	0,8886	0,7994	0,8395	0,7770	0,7905	0,7946	0,8434
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,0505	-0,0334	0,0470	0,1420	-0,0120	0,0562	0,0515
<i>EHW</i>	0,3566	0,4844	0,4171	0,0650	0,4928	1,0000	0,2339
<b>PL64</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	18	18	18	16	13	9	16
<i>Ar</i>	10,373	10,332	10,623	9,820	9,524	9,000	9,407
<i>Ho</i>	0,9688	1,0000	0,9500	0,7667	1,0000	0,7500	0,9500
<i>He</i>	0,9365	0,9298	0,9289	0,9299	0,9167	0,8929	0,8750
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0,0344	-0,0755	-0,0227	0,1755	-0,0909	0,1600	-0,0857
<i>EHW</i>	0,5122	0,6270	0,0271	0,0000	1,0000	0,1083	0,2962



**Tabela 5.** Continuação

<b>Locus</b>	<b>MG</b>	<b>SA</b>	<b>GR</b>	<b>PA</b>	<b>RE</b>	<b>BA</b>	<b>AP</b>
<b>PL03</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	10	8	7	9	5	4	6
<i>Ar</i>	5,865	5,968	3,998	6,179	4,030	4,000	4,117
<i>Ho</i>	0,3226	0,3478	0,4500	0,3333	0,5333	0,3750	0,2000
<i>He</i>	0,6957	0,6947	0,5605	0,8126	0,6500	0,6607	0,5855
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,5363	0,4993	0,1972	0,5898	0,1795	0,4324	0,6584
<i>EHW</i>	0,0000	0,0000	0,6740	0,0000	0,5030	0,0528	0,0000
<b>PL34</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	14	10	8	8	12	5	7
<i>Ar</i>	7,830	7,486	6,141	6,392	9,466	5,000	5,571
<i>Ho</i>	0,5000	0,7391	0,7000	0,8333	0,8000	0,6250	0,8000
<i>He</i>	0,8780	0,8666	0,8013	0,7851	0,9286	0,7054	0,7724
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,4305	0,1471	0,1264	-0,0615	0,1385	0,1139	-0,0358
<i>EHW</i>	0,0000	0,0037	0,0959	0,1841	0,0095	0,7740	0,7283
<b>Total</b>							
<i>A</i>	89	81	77	71	64	45	72
<b>Média</b>							
<i>N</i>	32	23	20	30	15	8	20
<i>Na</i>	14,83	13,50	12,83	11,83	10,67	7,50	12,00
<i>Ar</i>	8,2312	8,2415	8,0623	7,3322	7,8790	7,5000	7,6142
<i>Ho</i>	0,7153	0,7681	0,7583	0,6444	0,8000	0,7083	0,7167
<i>He</i>	0,8303	0,8432	0,8274	0,8367	0,8357	0,7857	0,8050
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,1484	0,1036	0,0921	0,2236	0,0509	0,1074	0,1366
<i>EHW</i>	<0,0001	<0,0001	0,0375	<0,0001	0,1618	0,5550	<0,0001

*N*: número de indivíduos, *Na*: número de alelos por locus, *A*: número total de alelos, *Ar*: riqueza alélica, *Ho*: heterozigosidade observada, *He*: heterozigosidade esperada. *EHW*: teste de Equilíbrio Hardy-Weinberg. *F<sub>IS</sub>*: coeficiente de consanguinidade.

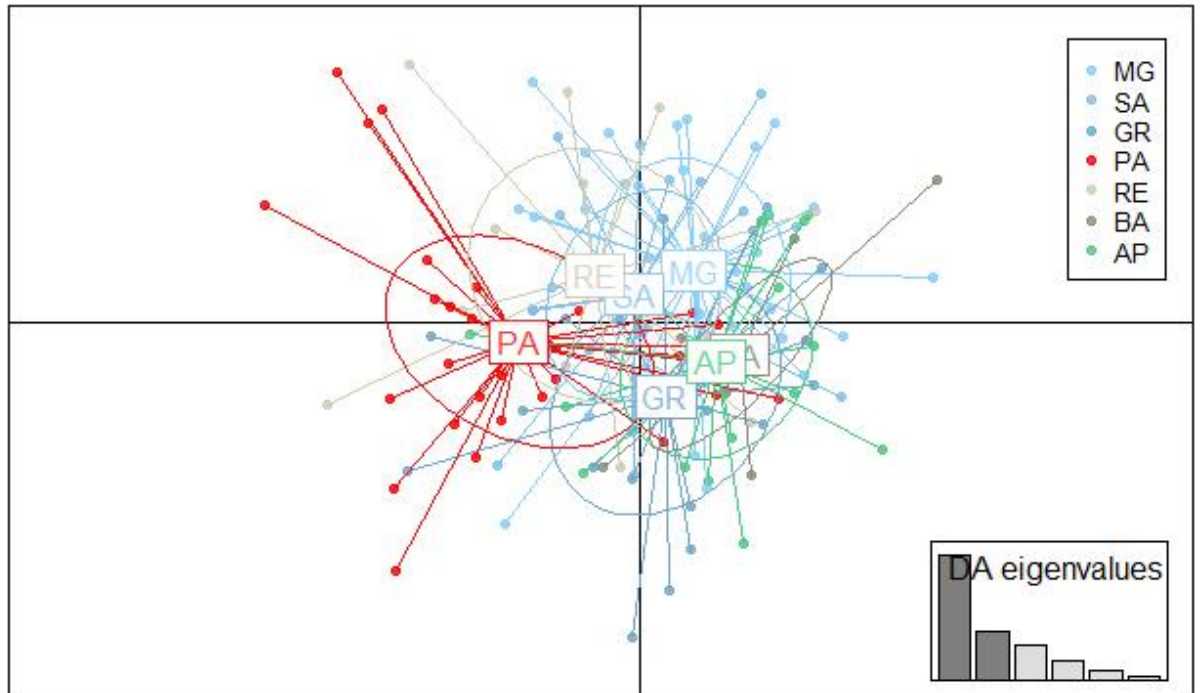


Figura 4. Análise de DAPC a partir dos dados de microsatélites.

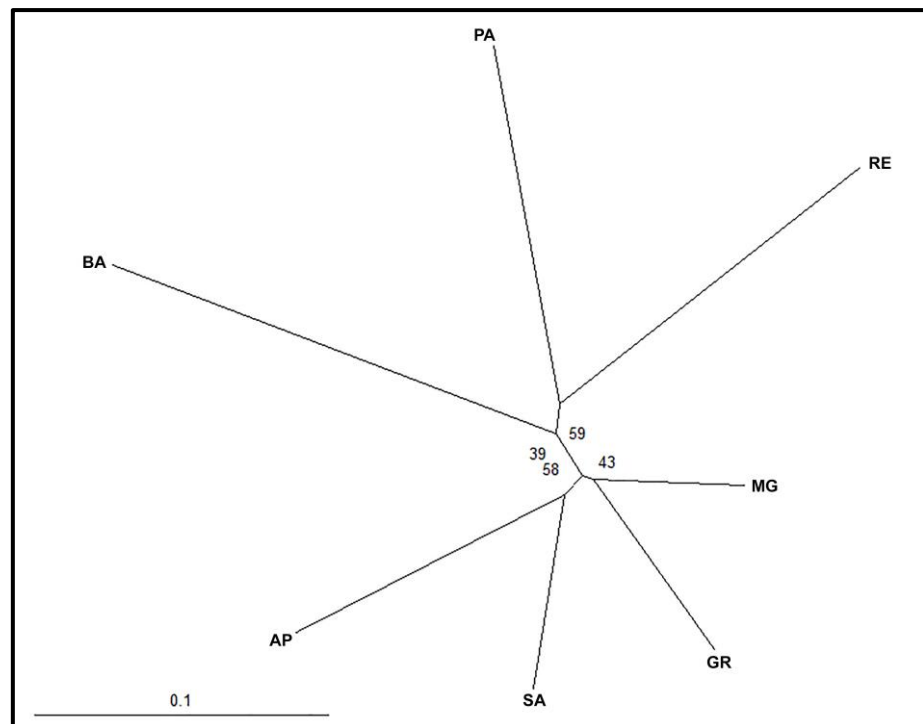


Figura 5. Dendrograma feito a partir dos dados de microsatélites.

Cromossomos B

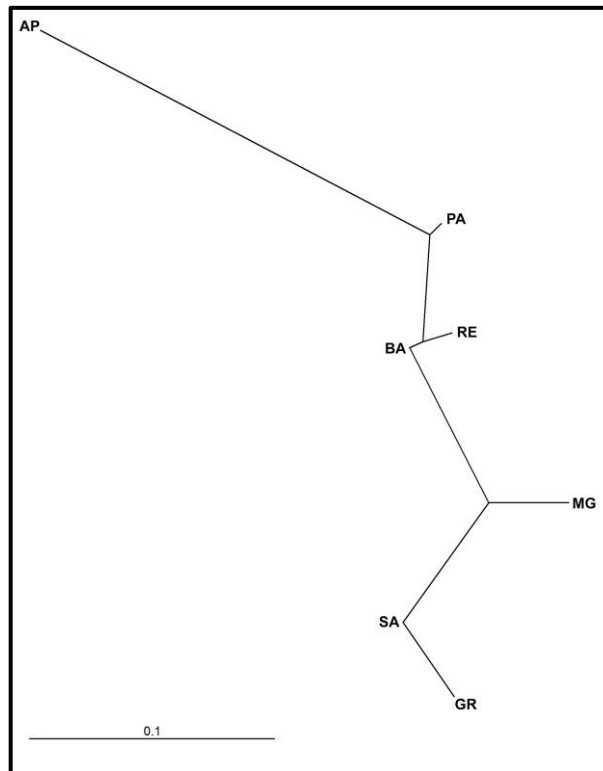
O número de Bs do tipo metacêntrico encontrado em todas as populações varia de zero a seis, enquanto que os tipos submetacêntrico e acrocêntrico apresentaram uma frequência que varia de zero a dois supranumerários (Tabela 6). Apenas nas localidades localizadas na bacia do rio Grande (MG, AS e GR) foram encontrados os três tipos de B (meta, submeta e acro). Na população PA e nos dois pontos situados na bacia do Tietê (RE e BA) foram encontrados apenas cromossomos B metacêntricos, com a exceção de apenas uma ocorrência de um B acrocêntrico em PA. Além disso, na população AP, localizada na bacia do rio Paraguai, todos os indivíduos analisados não apresentaram cromossomos supranumerários.

Os valores de  $F_{ST}$  e distâncias  $D_a$  de Nei obtidas a partir dos dados da frequência dos Bs entre todas as localidades analisadas estão descritas na Tabela 3. Os valores de  $F_{ST}$  encontrados variaram de 0,0034 (GR-SA) até 0,4161 (AP-GR). As distâncias  $D_a$  variaram de 0,0221 (GR-SA) até 0,4955 (AP-GR). O teste G de Fisher mostrou que a localidade AP se difere das demais, além disso, PA mostrou desvios significativos com as localidades do rio Grande (MG, SA e GR) e também houve diferenciação entre RE e GR ( $P < 0,0023$ , após correção de Bonferroni).

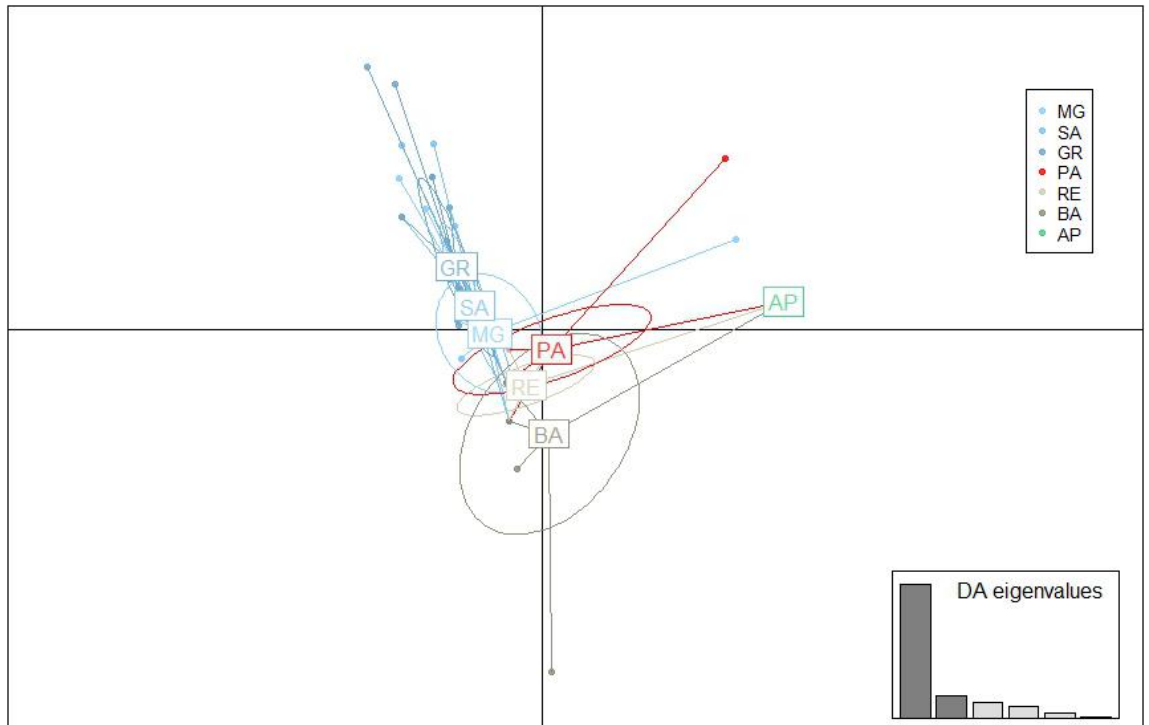
O resultado do teste de isolamento foi significativo, mostrando uma correlação positiva entre as distâncias genética (medida como  $F_{ST} / 1 - F_{ST}$ ) e geográfica ( $r = 0,80985$ ,  $P = 0,0079$ ). O dendrograma construído a partir dos valores de  $F_{ST}$  revelou grupos suportados para a bacia do rio Grande (MG-SA-GR), bacias dos rios Paraná/Tietê (PA-RE-BA) e bacia do Paraguai (AP) (Figura 6). As análises de DAPC mostraram os mesmos grupos suportados (Figura 7). Entretanto, o dendrograma construído a partir das distâncias  $D_a$  de Nei mostrou semelhanças, exceto pela localidade RE, a qual se apresentou em um grupo isolado (Figura 8).

**Tabela 6.** Frequências dos três tipos de cromossomos B encontrados nas populações de *P. lineatus* analisadas. Para obter esses valores, a ocorrência de cada tipo de cromossomo B foi considerada como um *locus* e a presença/ausência dos cromossomos B como seus alelos variantes.

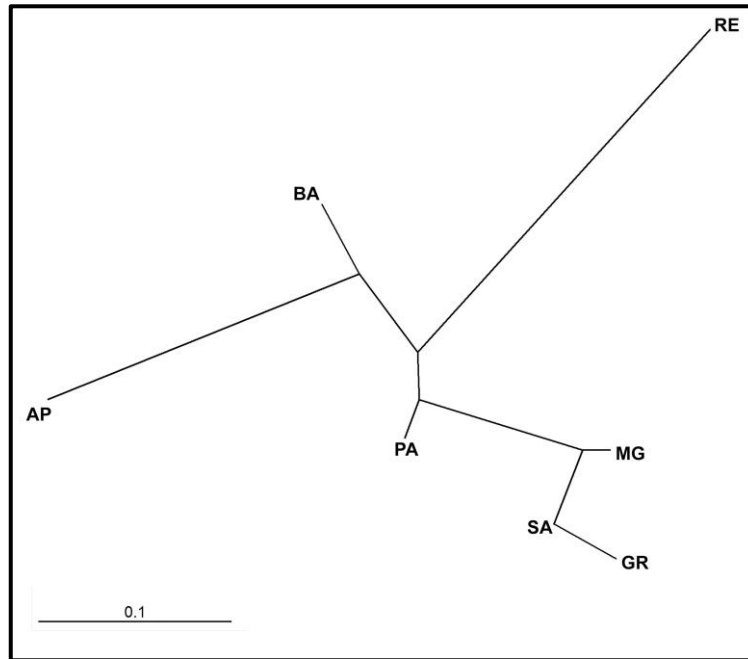
Pop	<i>Locus Meta</i>							<i>Locus Submeta</i>			<i>Locus Acro</i>		
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	S0	S1	S2	A0	A1	A2
MG	0,031	0,375	0,313	0,250	0,031	0,000	0,000	0,532	0,437	0,031	0,937	0,063	0,000
SA	0,000	0,260	0,522	0,131	0,087	0,000	0,000	0,783	0,173	0,044	0,696	0,260	0,044
GR	0,000	0,250	0,400	0,200	0,100	0,050	0,000	0,650	0,250	0,100	0,500	0,400	0,100
PA	0,167	0,500	0,300	0,033	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,967	0,033	0,000
RE	0,067	0,067	0,600	0,266	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000
BA	0,125	0,000	0,250	0,375	0,000	0,125	0,125	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
AP	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000



**Figura 6.** Dendrograma feito a partir dos valores de  $F_{ST}$  dos dados da ocorrência de cromossomos B.



**Figura 7.** Análise de DAPC envolvendo os dados das frequências dos cromossomos B.



**Figura 8.** Dendrograma feito a partir dos valores de  $F_{ST}$  dos dados de Da, Nei.

## Discussão

### Variabilidade do mtDNA

A análise do sequenciamento da região controle do mtDNA revelou altos níveis de diversidade genética ( $h = 0,8214 - 1,0000$  e  $\pi = 0,0084 - 0,0223$ ), de acordo com os dados reportados previamente para esta espécie (Garcez et al. 2011, Ferreira et al., 2017), para o mesmo gênero (Aguirre-Pabón et al., 2013) e para outras espécies migratórias de peixes (Hiltsdorf et al. 2002; Martins et al. 2003; Santos et al. 2007). Uma característica interessante é que dos 43 haplótipos obtidos 86,04% são *singletons*, estes dados são mais elevados que os encontrados recentemente por Ferreira et al. (2017) (65%) em *P. lineatus* no rio Paraná.

Os altos níveis de diversidade genética juntamente com o alto número de haplótipos únicos são uma característica comumente encontrada nos peixes migradores do Neotrópico (Ferreira et al., 2017). Este padrão está relacionado com espécies que apresentam um grande número efetivo populacional (Santos et al., 2007), como é o caso de *P. lineatus*, a qual é uma

das espécies mais abundantes na bacia do Paraná em termos de biomassa absoluta (Bonetto, 1994). Com um tamanho efetivo populacional grande implica também em um alto número de fêmeas, as quais podem influenciar no aumento do polimorfismo no mtDNA (Avisé e Zink, 1988).

A localidade PA revelou a menor variabilidade genética do mtDNA dentre todas analisadas ( $h = 0,8214$  e  $\pi = 0,0084$ ). Isto pode estar relacionado ao fato de estes exemplares serem componentes de um estoque de matrizes reprodutoras da hidroelétrica de Jupia, utilizadas em programas de repovoamento para mitigação de impacto ambiental. A frequente soltura de peixes provenientes de um pequeno estoque mantido sem conhecimento genético pode ter influenciado na redução da variabilidade genética dos estoques de peixes nesta localidade.

#### Diversidade dos microssatélites

Adicionalmente aos marcadores mitocondriais, os resultados obtidos a partir de análises de DNA nuclear utilizando marcadores microssatélites também mostraram altos níveis de diversidade genética em *P. lineatus* ( $He = 0,7857 - 0,8432$  e  $Na = 7,5 - 14,3$ ), estando acima da média estimada para peixes de água doce ( $He = 0,54$  e  $Na = 9,1$ , Dewoody e Avisé, 2000) e compatíveis com os previamente reportados para outras espécies de peixes migradores neotropicais (Calcagnotto et al., 2001; Barroso et al., 2005; Matsumoto e Hilsdorf, 2009). Além disso, estes resultados são similares aos obtidos anteriormente por outros autores para esta espécie em outras localidades, como a do rio Paraná e alguns tributários ( $He = 0,803 - 0,874$ , Ferreira et al., 2017), rio Grande ( $He = 0,778$ , Yazbeck e Kalapothakis, 2007) e rio Uruguai ( $He = 0,770 - 0,810$ , Rueda et al. 2013).

Além disso, altos níveis de diversidade genética parecem ser uma característica predominante dentro do gênero *Prochilodus*, como observado em *P. argenteus* ( $He = 0,473 -$

0,951, Barbosa et al., 2006, 2008; Hatanaka et al., 2006; Sanches et al. 2012; Melo et al., 2013), *P. costatus* (0,448 - 0,960, Carvalho-Costa et al., 2006, 2008; Melo et al., 2013) e *P. magdalenae* ( $H_e = 0,877$ , Berdugo e Barandica, 2014), provavelmente por que as espécies representantes deste grupo apresentam um intenso comportamento migratório.

O aumento da variação genética intrapopulacional é gerada primeiramente através de mutação e recombinação (Templeton, 2011). Entretanto, as mutações são raras e o fator que mais rapidamente contribuiu para o aumento da diversidade é o fluxo gênico a partir da imigração de indivíduos de outras populações (Laikre et al., 1999). Como a espécie *P. lineatus* é migradora, os altos valores de variabilidade genética observados podem estar relacionados com o contato entre diferentes populações, aumentando assim a heterozigosidade.

A partir da análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, é possível detectar fragmentação populacional, migração e seleção (Frankham et al., 2002). No presente estudo foram observados desvios significativos do EHW em quatro localidades (MG, AS, PA e AP), as quais estão relacionadas com os valores positivos de  $F_{IS}$  e excesso de homozigotos. Entre os fatores mais comuns responsáveis por desvios do EHW em microssatélites estão a ocorrência de alelos nulos, endogamia, efeito Wahlund e amostragem não aleatória (García de Leon et al., 2007).

Há duas causas possíveis para explicar os desvios do EHW nas populações analisadas. A primeira se deve aos programas de repovoamento que são conduzidos há décadas na bacia do Paraná, devido ao grande número de barragens construídas para as usinas hidroelétricas. Entretanto, essas ações mitigatórias foram realizadas sem o conhecimento genético prévio dos estoques naturais para a produção de alevinos nas pisciculturas, as quais utilizam um número reduzido de peixes por um longo período, resultando em uma homogeneização do estoque cultivado ficando cada vez mais distante do *gene pool* selvagem (Agostinho et al., 2010).



A segunda se deve ao fato da inundação do salto de Sete Quedas durante o projeto de construção da usina hidroelétrica de Itaipu. Esta barreira natural isolava a fauna de peixes das porções do alto e baixo Paraná (Bonetto et al. 1989). Além disso, em 2002 houve a construção do Canal da Piracema nesta localidade, favorecendo ainda mais a comunicação entre as diferentes faunas de peixes do baixo e alto Paraná, sendo possível então a ocorrência de um fluxo gênico entre estas duas porções isoladas.

Ambas as situações também podem ter influenciado nos dados obtidos a partir dos microssatélites em *P. lineatus*, os quais apresentaram deficiência de heterozigotos e níveis significativos de endogamia em todas as localidades, sugerindo que algumas amostras possam ter indivíduos de populações com diferentes frequências alélicas (efeito Wahlund) (Ferreira et al., 2017).

Além disso, os dados de microssatélites não indicaram a ocorrência recente da redução do tamanho efetivo das populações analisadas, ou seja, indícios de possíveis *bottlenecks*. Adicionalmente, a combinação da alta diversidade de haplótipos ( $h > 0,5\%$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi > 0,5\%$ ) são indícios de populações grandes e estáveis, as quais exibem uma longa história evolutiva ou contato secundário entre diferentes linhagens (Grant e Bowen, 1998), corroborando assim a ausência de *bottlenecks* encontrada neste estudo.

#### Ausência de estruturação populacional baseada nos marcadores moleculares

Apesar da alta diversidade genética apresentada pela análise utilizando os microssatélites e mtDNA região controle, não foi observada uma estruturação populacional. Os valores de  $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$  entre as populações são baixos ou não significativos (Tabela 3), similarmente com os dados da análise bayesiana ( $K = 1$ ). Embora a localidade PA tenha se apresentado um pouco mais divergente, mostrando que os programas de repovoamento

realizados há décadas sem o menor controle genético podem estar influenciando nas frequências alélicas e haplotípicas nesta região.

Muitos modelos foram descritos para explicar a estruturação populacional baseado na migração, como o modelo de ilha, ilha-continente, *stepping-stone* e isolamento por distância (IPD). No presente trabalho foi realizado uma análise de IPD nas diferentes localidades amostradas de *P. lineatus*, a partir do teste de Mantel, o qual correlaciona a distância geográfica com o valor de  $F_{ST}$  linearizado. O resultado dos testes de Mantel para os marcadores microssatélites e mtDNA rejeitaram a hipótese de isolamento por distância. Este resultado não é surpreendente, pois se trata de uma espécie com alto comportamento migratório, podendo se deslocar por mais de 1.000 km de distância (Sverlij et al., 1993).

Portanto, os resultados obtidos a partir da análise com marcadores nucleares e mitocondriais reforçam a hipótese de que *P. lineatus* forma uma população panmítica através da vasta rede de drenagem da bacia do Paraná, conforme sugerido anteriormente por outros autores (Revaldaves et al., 1997, 2016; Sivasundar et al., 2001; Garcez et al., 2011).

#### Estruturação populacional utilizando os cromossomos B

Embora as análises dos marcadores nucleares e mitocondriais não tenham evidenciado indícios de estruturação populacional, os resultados a partir da análise dos Bs sugerem a existência de diferentes populações de acordo com a localização geográfica. Este fato pode se dar devido aos cromossomos Bs apresentarem uma natureza dispensável e um potente mecanismo de transmissão, sendo muito mais suscetíveis à mutação que os cromossomos A, o que pode permitir uma evolução mais rápida que os marcadores mitocondriais e microssatélites. Portanto, o uso dos Bs como marcadores populacionais pode ser uma ferramenta eficiente quando se trata de espécies com baixa taxa de estruturação populacional,

como ocorre em *P. lineatus*. O fato dos cromossomos Bs serem aparentemente neutros evolutivamente torna possível a sua utilização em estudos populacionais.

Atualmente os Bs estão classificados entre os principais alvos de estudos da citogenética e biologia cromossômica. Estes elementos genômicos não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal dos organismos, são encontrados em todos os filós dos eucariotos e se comportam como cromossomos egoístas que permanecem nas populações sem conferir alguma vantagem as espécies portadoras (Jones e Rees, 1982; Jones, 1991). Além disso, os Bs podem variar em estrutura, tamanho e propriedades da cromatina de uma maneira espécie-específica. Geralmente é assumido que os Bs se derivaram dos cromossomos A, os quais podem ser da mesma espécie (origem intraespecífica) ou espécies relacionadas (origem interespecífica, revisado em Camacho et al., 2000).

É comumente referido a *drive* quando as taxas de transmissão dos cromossomos são maiores que 0,5, não obedecendo assim a lei mendeliana da segregação (Houben, 2017). Os cromossomos B mostram a forma mais comum de *drive* conhecida por elementos genéticos conhecida atualmente (Jones, 1991), entretanto, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvendo o *drive* (Houben, 2017).

A alta ocorrência de Bs sem o conhecimento de benefícios claros para a maioria das espécies portadoras aparenta estar relacionado com a sua elevada taxa de transmissão graças a mecanismos envolvendo o *drive*, que causam segregações não-mendelianas na meiose e eventos pós meióticos (Jones, 1991), ocasionando assim em uma acumulação ao longo das gerações. Estes mecanismos de acúmulo aumentam a probabilidade dos Bs serem retidos no genoma das espécies portadoras, de acordo com um modelo parasítico (Camacho et al., 2000).

Os cromossomos B podem apresentar frequências extremamente elevadas em populações naturais, dependendo de dois fatores principais: a tolerância de cada espécie a estes elementos adicionais e o potencial de transmissão (Camacho et al., 2000). A frequência

estável dos Bs é comumente encontrada por um longo período de tempo na mesma população, sendo resultado de duas forças opostas – o *drive* do cromossomo B (que tende a aumentar a frequência dos Bs) e o efeito prejudicial que os supranumerários podem apresentar aos portadores, sendo o mais comum o gasto energético extra (que tende a reduzir a frequência) (Camacho et al., 2000). Portanto, o polimorfismo cromossômico encontrado nos Bs pode ser visto como uma corrida armamentista entre os cromossomos A e B, que influencia na alteração da frequência dos supranumerários (Camacho et al., 2000).

Entretanto, no presente estudo temos marcadores moleculares (microsatélites e mtDNA) indicando uma ausência de estruturação populacional nesta espécie. Por outro lado, temos uma estruturação populacional com relação a frequência e distribuição dos cromossomos B em *P. lineatus*. Ao observar o levantamento de Penitente et al., (2016a) sobre o histórico da frequência dos Bs nesta espécie notamos que estes cromossomos apresentavam uma menor frequência no final dos anos 70 (média de 1,341), com um aumento e estabilização no final dos anos 80 (2,766) e se mantendo com uma frequência média estável variando entre 2,614 a 3,063 até o último registro de 2012.

A variação da frequência dos Bs entre populações depende basicamente de quatro fatores agindo simultaneamente: fatores seletivos (por exemplo, tolerância de Bs em cada espécie, condições ambientais em cada população) fatores históricos (número de gerações desde a origem do B), fatores de transmissão (intensidade de acúmulo de cada variante de B) e fatores aleatórios (como a ação da deriva genética e populações de tamanho reduzido) (Camacho et al., 2000).

No tocante à variação na frequência dos Bs neste estudo, provavelmente o fator histórico envolvendo o número de gerações desde a origem do B pode ter a maior influência. Portanto, duas evidências nos permitem levantar a hipótese de que o cromossomo B surgiu em *P. lineatus* na bacia do rio Grande, a primeira delas é a maior frequência média e baixa

ocorrência de indivíduos não portadores, a segunda é que o maior número de variantes de Bs (acro, meta e submeta) ocorre somente nesta bacia. Ambos os fatores são indícios de uma maior fixação e evolução dos supranumerários nestas localidades, ou seja, o cromossomo B na bacia do Grande provavelmente tenha começado a se estabelecer num período de tempo maior em relação aos Bs das outras localidades estudadas. Entretanto, como o cromossomo B metacêntrico é mais frequente e apresenta uma vantagem na transmissão em relação as demais variantes (Penitente et al., 2016a) é provável que este tipo se irradiou mais rapidamente que os demais tipos.

Melo et al. (2017) descrevem que os Bs em *Prochilodus* surgiram a partir de um antigo evento filogenético dentro do gênero, devido a elevada ocorrência dos Bs dentre as espécies cariotipadas, além da similaridade morfológica dos supranumerários neste grupo. Entretanto, os dados aqui apresentados sugerem uma origem mais recente dos Bs em *P. lineatus*, o que nos permite levantar a hipótese de que os Bs em *Prochilodus* podem ter uma origem similar a partir dos mesmos mecanismos ou rearranjos cromossômicos.

A expansão dos cromossomos B para novas populações se dá principalmente através da migração e fluxo gênico. A maioria dos peixes migradores neotropicais são potamódromos, conhecidos popularmente como peixes de piracema. Os peixes de piracema são frequentemente de grande porte e ocorrem com maior abundância em rios não represados, sendo de grande importância econômica no Brasil (Godinho e Kynard, 2009). Após o período de reprodução destes peixes os ovos e larvas se dispersam apenas no sentido rio-abaixo e, após um período, os juvenis começam a migrar rio-acima, sendo este também o sentido mais comum de migração durante o período reprodutivo dos peixes de piracema (Godinho e Kynard, 2009).

Portanto, se levarmos em consideração a hipótese proposta sobre a origem dos cromossomos B na bacia do rio Grande, a qual se situa em uma das porções mais rio-acima da

bacia do rio Paraná, podemos inferir que a irradiação dos cromossomos B tende a ser mais lenta no sentido rio-abaixo, devido ao comportamento reprodutivo de *P. lineatus*, o qual favorece o movimento rio-acima durante a desova. Entretanto, o comportamento de migração no sentido rio-acima ainda é pouco estudado, mas sabemos que alguns juvenis provavelmente chegam aos lugares de desova usados pelos pais, porém, alguns podem se desviar para as águas não natais (Godinho e Kynard, 2009), o que faria que o cromossomo B colonizasse novas populações através do fluxo gênico e mecanismos de acúmulo. Por outro lado, se supormos um surgimento dos Bs na porção rio-abaixo da bacia do Paraná, seria provável de que esta irradiação dos Bs se daria de uma maneira mais rápida para novas populações através da migração e os mecanismos de *drive* envolvendo os Bs.

Por fim, como agora as porções do baixo e alto Paraná estão conectadas através da inundação do salto de Sete Quedas e da construção do Canal da Piracema, o que possibilita o fluxo gênico entre estas duas porções, podemos inferir que é uma questão de tempo até que o cromossomo B possa colonizar as populações da bacia do rio Paraguai e as demais do baixo Paraná através do fluxo gênico e a potente ação do *drive* presente nos supranumerários de *P. lineatus*.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos trabalhos envolvendo cromossomos B foram realizados, tentando elucidar sua origem, função e manutenção nas espécies portadoras. Estes elementos genômicos intrigam os pesquisadores por que aparentemente apresentam material genético dispensável, porém ainda persistem em diversos grupos de animais. Além disso, apresentam mecanismos de acúmulo e caminhos evolutivos distintos dos cromossomos do complemento padrão A. Nos últimos anos houve um aumento significativo de estudos envolvendo os cromossomos B, mas ainda muito pouco se sabe sobre eles, principalmente pelo fato de que o número de características comuns a todos os Bs é limitado.

Os peixes têm se destacado em estudos envolvendo cromossomos supranumerários, devido a descoberta de sua ocorrência em novas espécies e a grande variabilidade, seja morfológica ou numérica, destes elementos nos organismos portadores. No entanto, muitos estudos têm buscado atribuir uma função, investigar a estrutura, origem e transmissão desses elementos, mas o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular e estrutural dos cromossomos B em peixes ainda é considerado bastante restrito.

No presente trabalho descrevemos a ocorrência de Bs para 73 espécies de peixes neotropicais. No entanto, se levarmos em consideração a estimativa de cerca de 8.000 espécies de peixes para o Neotrópico e que apenas cerca de 10% destas espécies estão cariotipadas, podemos afirmar que o real número de espécies portadoras pode ser muito maior na medida que os estudos citogenéticos em peixes aumenta.

Além disso, os dados obtidos a partir da distribuição dos Bs em *P. lineatus* nos permitiu levantar hipóteses sobre a origem dos supranumerários na bacia do rio Grande com uma gradual e lenta dispersão no sentido rio-abaixo, o que pode ser considerado o sentido mais lento para o fluxo gênico em espécies migradoras. Adicionalmente, pudemos observar a evolução dos Bs nesta espécie mediante dados aqui apresentados juntamente com os diversos

registros de estudos, desde a sua primeira descrição no final dos anos 70. Sendo que atualmente contamos com um panorama em que há o maior polimorfismo dos Bs na bacia do Grande, entretanto, já podemos notar o surgimento de novas variantes na localidade de Reginópolis, além ausência de Bs na bacia do rio Paraguai.

Por fim, estes dados aqui apresentados podem se modificar em um curto período de tempo, inclusive em poucas gerações, pois os Bs são elementos dispensáveis do genoma e apresentam uma elevada taxa evolutiva o que pode acabar influenciando nas frequências das variantes nas diferentes localidades através do *drive* e fluxo gênico.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho AA, Gomes LC, Veríssimo S, Okada EK (2004) Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(1):11-19.
- Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impact and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology*, 68:1119-1132.
- Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC, Júlio-Junior HF (2010) Reservoir fish stocking: when one plus one may be less than two. *Nat Conservação*, 08:103-111.
- Aguirre-Pabón J, Barandica JN, García LC (2013) Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquat Conserv*, 23:594-605.
- Albert JA, Petry P, Reis RE (2011) Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: Albert JS, Reis RE (eds) *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, pp. 21-58.
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res*, 97:229-233.
- Araújo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F, Camacho JPM (2002) Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited. *R. Soc. Lond.*, 269:1475-1478.
- 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

Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006) Banding pattern of and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Gen. Mol. Biol.*, 127:277-284.

Avise JC, Giblin-Davidson C, Laerm J, Patton JC, Lansman RA (1979a) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:6694-6698.

Avise JC, Lansman RA, Shade RO (1979b) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92:279-295.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, ... Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1):489-522.

Avise JC, Zink RM (1988) Molecular genetic divergence between avian sibling species: king and clapper rails, longbilled and short-billed dowitchers, boat-tailed and greatailed grackles, and tufted and black-crested titmice. *Auk*, 105:516-528.

Avise JC (1992) Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6):1192-1208.

Ayres M (2007). *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá.

Barbarino Duque A, Taphorn D, Winemiller K (1998) Ecology of the coporo, *Prochilodus mariae* (Characiformes, Prochilodontidae), and status of annual migrations in western Venezuela. *Environ Biol Fishes*, 53:33-46. doi:10.1023/a:1007447004451

- Barbosa ACDR, Corrêa TC, Galzerani F, Galetti JRPM, Hatanaka T (2006) Thirteen polymorphic microsatellite locos in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Mol Ecol Notes*, 6:936-938.
- Barbosa ACDR, Galzerani F, Corrêa TC, Galetti JRPM, Hatanaka T (2008) Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genet Mol Biol*, 31:357-360.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Cabello PH, Traub-Cseko YM (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, 247:51-65.
- Bayley PB (1973) Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg 1889, (Pisces, Characoidei) in the river Pilcomayo, South America. *J Fish Biol*, 5:25-40. doi:10.1111/j.1095-8649.1973.tb04428.x
- Berdnikov VA, Gorel FL, Kosterin OE, Bogdanova VS (2003) Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. *Heredity*, 91:577-583.
- Berdugo GO, Barandica JCN (2014) Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genet Mol Biol*, 37:37-45.
- Bonetto AA, Wais I, Castello HP (1989) The increasing damming of the Paraná basin and its effects on the lower reaches. *Regulated Rivers: research and management*, 4(4):333-346.
- Bonetto AA (1994) Austral rivers of South America in Margalef R (Ed.), *Limnology now: a paradigm of planetary problems*, Elsevier Science, New York, pp. 425-472.
- Borin LA, Martins-Santos IC (2004) Study on karyotype and occurrence of B chromosome in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from river Iguaçú. *Hereditas*, 140:201-209.

- Born GG, Bertollo LAC (2000) An XX/XY Sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8:111-118.
- Bougourd SM, Plowman AB (1996) The inheritance of chromosome in *Allium schoenoprasum* L. *Chromosome Research*, 4:151-158.
- Brea, M., A. F. Zucol. 2011. The Paraná-Paraguay Basin: Geological and Paleoenvironmental. In: Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Albert, J. S, Reis, R. E. (eds). University of California Press, pp. 69-87.
- Brito PM, Meunier FJ, Leal MEC (2007) Origine et diversification de l'ichthyofaune Neotropical: Une revue. *Cybium*, 31:139-153.
- Britski HÁ, Sato Y, Rosa ABS (1988) Manual de identificação de peixes da região de três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª Ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação - CODEVASF, 115p.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1967-1971.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 195p.
- Burt A, Trivers R (2006) *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Cambridge: Belknap Press of Harvard University.
- Cabrero J, López-Léon MD, Bakkali M, Camacho JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 83:435-439.
- Cabrero J, López-Léon MD, Ruíz-Estévez M, Gómez R, Petitpierre E, Rufas JS, Massa B, Kamel Ben Halima M, Camacho JPM (2013) B<sub>1</sub> Was the Ancestor B Chromosome

- Variant in the Western Mediterranean Area in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Cytogenet Genome Res, 142(1):54-58. doi: 10.1159/000356052.
- Calcagnotto D (1998) Caracterização de bancos genéticos selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial, 131 f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo/SP.
- Calcagnotto D, Russello M, Desalle R (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. Mol Ecol Notes, 1:245-247.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Am Nat, 149:1030-1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW (2000) B-chromosome evolution. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 355:163-178.
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR (ed) The evolution of the genome, 1st edn. Elsevier, San Diego, pp. 223-286.
- Carmo AO, Dias PFPB, Martins APV, Bedore AG, Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Mitochondria DNA, 27(3):1946-1947.
- Carvalho FR, Langeani F (2013) *Hyphessobrycon uaiso*: new characid fish from the rio Grande, upper rio Paraná basin, Minas Gerais State (Ostariophysi: Characidae), with a brief comment about some types of *Hyphessobrycon*. Neotropical Ichthyology, 11(3):525-536.
- Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Galetti PM (2006) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. Mol Ecol Notes, 6:818-819.

- Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Galetti PM Jr (2008) Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genet Mol Biol*, 31:377-380.
- Castro J, Rodríguez S, Pardo BG, Sánchez L, Martínez P (2001) Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*, 86(3):291-302.
- Castro RCM, Vari PP (2004) Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contribution to Zoology* n.622. Washington, DC. Smithsonian books, 189p.
- Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM (2000) Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. *Chrom. Res*, 8:627-634.
- Cebriá A, Navarro ML, Puertas MJ (1994) Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). *Am J Bot*, 81:1502-1507.
- Cole CJ, Leavens CR (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol.*, 49:102.
- Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti P (2013) Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). *Caryologia*, 65(3):229-233.
- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol*, 56:461-473.
- Dias AL, Foresti F, Oliveira C (1998) Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). *Caryologia* 51:105-113.

- Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC (2009) Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Gen Mol. Biol.*, 32:37-41.
- Drouin G, Muniz de Sá M (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.*, 12:481-493.
- Eickbush DG, Eickbush TH, Werren JH (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma*, 101:575-583.
- Erdtmann B, Calcagnoto D, Rabolini L, Malabarba LR (1990) Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). *Ciênc Cult*, 42:452.
- Eschmeyer, WN, Fong JD (2017) (Ed.). Species by family/subfamily electronic version. Disponível em  
<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
- Espinach Ros A, Sverlij S, Mestre J, Fabiano G, Amestoy F (1990) Desplazamientos migratorios de peces marcados en el tramo inferior del río Uruguay. In: Resúmenes de Comunicaciones Segundo Seminario “El Rio Uruguay: Sus Recursos Pesqueros”, Concepción del Uruguay, Entre Rios, Argentina. Comisión Administradora del Rio Uruguay (CARU).
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131:479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Rev. Brasil. Genet*, 11(4):847-852.

- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JPM (2000) B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biol*, 48:105-109.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1990) Supranumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genética*, 81:193-198.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodhon A, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol*, 47:103-126.
- Ferreira DG, Souza-Shibatta L, Shibatta OA, Sofia SH, Carlsson J, Dias JHP, Makrakis S, Makrakis MC (2017) Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. *Rev Fish Biol Fisheries*, 27:209-231. doi:10.1007/s11160-016-9441-2
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, 119:147-153.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, 31:137-144.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo AS (1989) Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79:107-114.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49:810-813.
- Foresti F (1998) Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supernumerários em peixes. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicas, Londrina, Paraná. p. A1.



- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, UK, 607 pp.
- Galetti Jr PM (1998) Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.*, 65:53-56.
- Garcez R, Calcagnotto D, Almeida-Toledo LF (2011) Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 21:268-275.
- García de León FJ; Chikhi L, Bonhomme F (1997) Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.*, 6:51-62
- Gauthier DT, Audemard CA, Carlsson JEL, Darden TL, Denson MR, Reece KS, Carlsson J (2013) Genetic population structure of US Atlantic coastal striped bass (*Morone saxatilis*). *J Hered*, 104:510-520. doi:10.1093/jhered/est031
- Godinho AL, Kynard B (2006) Migration and spawning of radiotagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed Brazilian River. *Trans Am Fish Soc*, 135:811-824. doi:10.1577/t04-176.1
- Godinho HP (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicada à aquicultura: bases para o desenvolvimento de Tecnologia de Produção. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 31:351-360.
- Godinho AL, Kynard B (2009) Migratory fishes of Brazil: life history and fish passage needs. *River. Res. Applic.*, 25:702-712. doi: 10.1002/rra.1180
- Godoy MP (1975) Peixes do Brasil; Sub-ordem Characoidei. *Bacia do Rio Mogi-Guaçu*. Piracicaba, Ed. Franciscana, 4:631-847.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>].

- Goulding M (1981) Man and fisheries on an Amazon frontier. Kluwer Academic Publishers, 137p.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered*, 89:415-427.
- Hafez T, Labat R, Quiller R (1978) Aneuploidie observes chez les population de gardons (*Rutilus rutilus* L.) et d'ablettes (*Alburnus alburnus* L.) de la regions Mii-Pyrenees. *Bull Soc Nat Toulouse*, 114:85-92.
- Hakansson A (1948) Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryosac. *Hereditas*, 34:35-59.
- Hakansson A (1945) Überzählige chromosome in einer rasse von *Godetia nutans*. *Hiorth. Bot. Notiser*, 2:1-19.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41:95-98.
- Harrison RG (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree*, 4(1):6-11.
- Hatanaka T, Silva FH, Galetti PM Jr (2006) Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126:153-159.
- Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2008) First report of a B chromosome in population of the *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Gen. Mol. Biol.*, 31:275-278.
- Hashimoto DT, Voltolin TA, Arruda-Paes ADN, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia*

- sanctaeofilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). *Comparative Cytogenetics*, 6:141-151.
- Henriques-Gil N, Santos JL, Arana P (1984) Evolution of complex polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma*, 89:290-293.
- Henriques-Gil N, Arana P (1990) Origin and substitution of B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution*, 44:747-753.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM (1996) Evidence for B chromosome drivesuppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 76:633-639.
- Hilsdorf AWS, Azeredo-Espin AML, Krieger MH, Krieger JE (2002) Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*, 214:81-91.
- Hilsdorf AWS, Moreira RG (2008) Piracema, por que os peixes migram? *Scientific American Brasil*, 79:76-80.
- Hilsdorf AWS (2013) Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil, 159f. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71:467-478.
- Houben A (2017) B Chromosomes - A Matter of Chromosome Drive. *Front. Plant Sci.*, 8:210. doi: 10.3389/fpls.2017.00210
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.

- Jamilena M, Ruíz-Rejón C, Ruíz-Rejón M (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *J. Cell. Sci.*, 107:703-708.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruíz-Rejón M, Ruíz-Rejón C, Parker JS (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, 104:113-120.
- Jesus CM, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia*, 56:281-287.
- Jesus CM, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, 118:25-32.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11:94.
- Jones RN, Rees H (1982) *B Chromosomes*. - Academic Press.
- Jones RN (1985) Are B chromosome selfish? Cavalier Smith, T. (ed.), *The evolution of genome size*. Wiley, 397-425p.
- Jones RN (1991) B-Chromosome drive, *Am. Nat.*, 137(3):430-442.
- Jones RN (1995) B chromosomes in plants. - *New Phytol.*, 131:411-434.
- Jones RN, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapes from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*, 8:417-423.
- Jones N (2017) New species with B chromosomes discovered since 1980. *The Nucleus*, 1-19.
- Keyl HG, Hägele K (1971) B chromosome bei *Chironomus*. *Chromosoma*, 36:403-417.
- Kuwada Y (1915) Ueber die chromosomenzahl von *Zea mays*. L. *Bot Mag.*, 29:83-89.

- Laikre L, Antunes A, Alexandrino P (1999) Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. In: Laikre L et al (eds) “Troutconcert”: EU Fair CT97-3882. Stockholm University, Sweden.
- Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, Shibatta OA, Pavanelli CS, Casatti L (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7(3):181-197.
- Langella O (2002) POPULATIONS 1.2.26. Logiciel de Génétique de populations. Laboratoire populations, génétique et évolution. CNRS UPR 9034. Gif-sur-Yvette. France [available from [http://www.bioinformatics.org/project/?group\\_id=84](http://www.bioinformatics.org/project/?group_id=84)].
- Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogen. Cell Genet.*, 26:36-40.
- Levin DA, Palestis BG, Jones RN, Trivers R (2005) Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution*, 59:962-969.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Lima RMG (1998) Polimorfismos de microssatélites em DNA de equinos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador, 91 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (1993) Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). *Heredity*, 71(4):352-362.
- López-León MD, Veves N, Schwarzacher JS, Heslop-Harrison JS (Pat), Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chrom. Res.*, 2:87-92.

- Lowe-McConnell R (1975) Fish communities in tropical freshwaters. New York, Longman. 337p.
- Lozano R, Rejon CR, Rejon MR (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology*, 66(6):335-338.
- Lucas MC, Baras E, Thom TJ, Duncan A, Slavík O (2001) Migration of freshwater fishes. Wiley Online Library, London.
- Mago-Leccia FM (1972) Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), com uma sinops de la espécies de Venezuela. *Acta Biol.Venez.*, 8:35-96.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2000) Cytogenetic analysis of A and B-chromosome of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica*, 108:119-125.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1992) Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, 87:101-106.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7:639-655.
- Martínez JL, Morán P, Garcia-Vázquez E, Pendás AM (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogen Cell Genet.*, 73:149-152.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F (2003) Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genet Mol Biol*, 26:33-38.

- Martins-Queiroz MF, Mateus FL, Garutti V, Venere PC (2008) Reproductive biology of *Triportheus trifurcatus* (Castelnau, 1855) (Characiformes: Characidae) in the middle rio Araguaia, MT, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(2):231-236.
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, et al. (2012) Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33):13343-13346.
- Matsumoto CK, Hilsdorf AWS (2009) Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotrop Ichthyol*, 7:395-402
- McVean GT (1995) Fractious chromosomes hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *BioEssays*, 17:579-582.
- Melo BF, Sidlauskas BL, Hoekzema K, Frable BW, Vari RP, Oliveira C (2016) Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102:189-201.
- Melo DC, Oliveira DAA, Seerig A, Carvalho DC (2008) Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. *Rev Bras Reprod Anim*, 32(4):220-224.
- Melo BF, Sato Y, Foresti F, Oliveira C (2013) The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotropical Ichthyology*, 11(3):625-636.
- Melo S, Utsunomia R, Penitente M, Sobrinho-Scudeler PE, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F, Dergam JA (2017). B chromosome dynamics in *Prochilodus costatus*

- (Teleostei, Characiformes) and comparisons with supernumerary chromosome system in other *Prochilodus* species. *Comparative Cytogenetics*, 11:393.
- Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL (2003) Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo 159p.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosomes. *Heredity*, 85:1-9.
- Ministério da Pesca e Aquicultura (2011) Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, p.17-22.
- Moraes-Neto A, Silva M, Motoso DA, Vicari MR, Almeida MC, Collares-Pereira MJ, Artoni RF (2011) Karyotype variability in Neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei:Siluriforme). *Neotropical Ichthyology*, 9:97-105.
- Morán P, Martínez JL, García-Vásquez E, Pendás AM (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 75:145-150.
- Morelli KA (2008) Migração do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Prochilodontidae, Characiformes) no rio Mogi-Guaçu: aspectos genético-populacionais, 141 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Moreira CR (2007) Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi), 468 f. Tese (Doutorado em Ciências (Zoologia)) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moreira HLM (1999) Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites, 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 66:59-64.



- Müntzing A (1944) Citological studies of extra fragment chromosomes in rye I. Isofragments produced by misdivision. *Hereditas*, 30:231-248.
- Müntzing A (1948) Accessory chromosomes in *Poa alpina*. *Heredity*, 2:49-61.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. 4th eds. New York: John, 601p.
- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosome in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108:211-215.
- Noletto RB, Guimarães FSF, Paludo KS, Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM (2007) Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Mar Biotechnol*, 11:680-685.
- Nur U (1966a) Harmful B chromosomes in a mealy bug population. *Genetics*, 54:1225-1238.
- Nur U (1966b) The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. *Genetics*, 54:1239-1249.
- Nur, U (1977) Maintenance of a “parasitic” B chromosome in the grasshopper *Melonoplus femur-rubrum*. *Genetics*, 87:499-512.
- Nur U, Brett BLH (1987) Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis (obscurus)*. *Genetics*, 115:499-510.
- Nur U, Brett BLH (1988) Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma*, 96:205-212.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41:227-236.

- Oliveira C, Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios*, 76:183-186.
- Oliveira C, Saboya SMR, Foresti F, Senhorini JA, Bernardino G (1997) Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, 79:473-476.
- Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S (2003) Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus Kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei:Prochilodontidae from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 1:47-52.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. (Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG Eds) *Fish Citogenetics*. Science Publishers USA, 111-152p.
- Oliveira C Foresti F Hilsdorf AWS (2009) Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35:81-100.
- Otero O, Gayet M (2001) Palaeoichthyofaunas from the lower Oligocene and Miocene of the Arabian Plate: palaeoecological and palaeobiogeographical implications. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 165:141-169.
- Östergren G (1945) Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot. Notiser*, 2:157-163.
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12:357-358.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2014) Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PloS one*, 9(9):e107169.

- Parker JS, Taylor S, Ainsworth CC (1982) The B chromosome system of *Hypochoeris maculata*. III. Variation in B chromosome transmission rates. *Chromosoma*, 85:229-310.
- Pauls E, Bertollo LAC (1990) Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of cariotipic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81:117-123.
- Pauls E, Bertollo LAC (1983) Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36(4):307-314.
- Peixer J, Petreire Júnior M (2009) Sport fishing in Cachoeira de Emas in Mogi-Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Braz J Biol*, 69:1081-1090.
- Pendás AM, Morán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, 67:31-36.
- Penitente M, Voltolin TA, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2013) Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 85(4):1371-1377. doi: 10.1590/0001-3765201387611.
- Penitente M, Foresti F, Porto-Foresti F (2015) B chromosomes in the species *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae): morphological identity and dispersion. *Comparative Cytogenetics*, 9(1):79-87.
- Penitente M, Daniel SN, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2016a) Transmission Behavior of B Chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 147:179-185. doi: 10.1159/000443384

- Penitente M, Daniel Sn, Scudeler Pes, Foresti F, Porto-Foresti F (2016b) B chromosome variants in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) analyzed by microdissection and chromosome painting techniques. *Caryologia*, 69:1-6.
- Peppers JA, Wiggins LE, Baker RJ (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, 5:475-479.
- Perfectti F, Werren JH (2001) The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. *Evolution*, 55:1069-1073.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered*, 90:502-503.
- Pohler W, Schlegel R (1990) A rye plant with frequent A-B chromosome pairing. *Hereditas*, 112:217-220.
- Porto FE, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC (2010) Possible origins of the B chromosome in *Rinelocaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná river basin. *Genetics and Molecular Research*, 9:1654-1659.
- Porto-Foresti F (2001) Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento, 119 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F (2010) A hibridação interespecífica em peixes. *Panorama da Aquicultura*, 21(126):28-33.
- Potter PE (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. *Journal of South American Earth Sciences*, 10:331-344.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population Structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2):945-59.
- Ramos É, Cardoso AL, Brown J, Marques DF, Fantinatti BE, Cabral-de-Mello DC, Oliveira RA, O'Neill RJ, Martins C (2017). The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. *Chromosoma*, 126(2):313-323.
- Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA (2016) Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89:12–47. doi:10.1111/jfb.13016.
- Revaldaves E, Renesto E, Machado MFPS (1997) Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3):381-388.
- Revaldaves E, Renesto E, Gold JR (2016). Genetic variation of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) from Paraná, Baía, Miranda, and Corumbá rivers, Brazil. *Genetics and molecular research: GMR*, 15(4).
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the fresh- water fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4:225-246.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43:223-225.
- Rohlf FJ (1993) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1. Setauket, New York.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145:1219-1228.
- Rousset F (2008). Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 8:103-106.

- Rueda EC, Sommer J, Scarabotti P, Markariani R, Ortí G (2011) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Conserv Genet Resour*, 3:681-684.
- Rueda EC, Carriquiriborde P, Monzón AM, Somoza GM, Ortí G (2013) Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genetica*, 141(7-9):401-407.
- Salvador LB, Moreira-Filho O (1992) B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69:50-56.
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L; Dias AL (2011) B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics*, 5(4):301-313.
- Sanches A, Galetti PM Jr, Galzerani F, Derazo J, Cutilakbianchi B, Hatanaka T (2012) Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Lat Am J Aquat Res*, 40:177-186.
- Sanna-Kaisa J, Jukka S (2004) Sustainable use of ornamental fish populations in Peruvian Amazonia. *Lyonia*, 7(2):53-59.
- Santorum JM, Darriba D, Taboada GL, Posada D (2014) jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution models on the cloud. *Bioinformatics*, 30(9):1310-1311.
- Santos MCF, Ruffino ML, Farias IP (2007) High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *J Fish Biol*, 71:33-44.
- Santos LPD, Castro JP, Francisco CMD, Vicari MR, Almeida MCD, Goll LG, Gusso L, Morelli S, Artoni RF (2013) Cytogenetic analysis in the Neotropical fish *Astyanax*

- goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*, 6(1):1-10.
- Sapre AB, Despanche DS (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.*, 78:191-196.
- 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: 68-71.
- 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
- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10:407-418.
- Shaw MW, Hewitt GM, Anderson DA (1985) Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity*, 55:61-68.
- Shaw MW, Hewitt GM (1985) The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity*, 54:259-268.
- Shaw MW, Hewitt GM (1990) B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next?. Futuyma D and Antonovics J (eds), *Oxford surveys in evolutionary biology*. Oxford Univ. Press, 197-223p.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsonomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA

- sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141:329-336.
- Stevens NM (1908) The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. *J. Exp. Zool.*, 5:453-470.
- Studart MT (2001) Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP, 2001 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Sumner AT (1972) Chromosome Banding. Unwin Hyman Inc. Cambridge 434p.
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y (1996) Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.*, 72:1-4.
- Sverlij SB, Espinach Ros A, Ortí G (1993) Synopsis de los datos biológicos del sabalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), (No. 154). Food and Agriculture Organization of the United Nations—FAO Fisheries Synopsis, pp 1-67.
- Tamura K (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular biology and evolution*, 9(4):678-687.
- Taylor AI (1967) Patau's, Edwards' and cri du chat syndromes: A tabulated summary of current findings. *Develop. Med. Child Neurol.*, 9:78.
- Templeton AR (2011) Genética de populações e teoria microevolutiva. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 705 p.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratória*. *Chromosome Research*, 17:11-18.



- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25:4876-4882.
- Toledo-Filho SA, Calcagnotto D, Bernardino G, Fernandes-Matioli FMC, Moysés CB, Almeida-Toledo LF, Foresti F (1999) Projeto de Bancos Genéticos na Piscicultura Brasileira. *Cadernos de Ictiogenética* 5. CCS/USP, São Paulo, SP.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Galhardo E, Donola E (1992) Conservação Genética de Peixes em Projetos de Repovoamento de Reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética* 1. CCS/USP, São Paulo, SP.
- Tosta VC, Marthe JB, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM, Pompolo SG, Recco-Pimentel SM, Perfectti F, Campos LAO, Camacho JPM (2015) Possible Introgression of B Chromosomes between Bee Species (Genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(3), 220-226. doi:10.1159/000370171
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD, Martins C (2014) Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol Biol Evol*, 31:2061-2072.
- Valente GT, Nakajima RT, Fantinatti BEA, Marques DF, Almeida RO, Simões RP, Martins C (2017) B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, 126:73-81. doi: 10.1007/s00412-016-0613-6
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.

- Vari RP (1983) Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 378:1-60.
- Vari RP, Malabarba LR (1998) Neotropical Ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Ed.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 1-11.
- Venere PC, Miyazawa CS, Galetti Jr. PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genet Mol Biol*, 22:345-349.
- Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF (2006) Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes Prochilodontidae). *Genet and Mol Biol*, 29:621-625.
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica*, 139:1073-1081.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic Cell Genet*, 74:70-75.
- Vicente VE, Jesus CM, Moreira-Filho O (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 4:365-369.
- Volobujev VT (1981) The B-chromosome system of mammals. *Caryologia*, 34:1-23.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2009) Cytogenetic Markers in Wild Population of Curimatá (*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. *Cytologia*, 74(3):281-287.

- Voltolin TA, Senhorini JA, Laudicina A, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010a) Origin and Molecular organization of Supernumerary Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica*, 138(11-12):1133-1139. doi: 10.1007/s10709-010-9502-8.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010b) B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 138(3):281-284. doi: 10.1007/s10709-009-9420-9.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010c) Supernumerary chromosome inheritance in the curimbatá (*Prochilodus lineatus*) of the Mogi-Guaçu River. *Hereditas*, 147:127-131.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Foresti F, Bortolozzi, J, Porto-Foresti F (2011) Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 34(2):220-224.
- Voltolin TA, Penitente M, Mendonça BB, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2013a) Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genet and Mol Biol*, 36(3):347-352.
- Voltolin TA, Pansonato-Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto-Foresti F (2013b) Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res*, 141(2-3):206-211. doi: 10.1159/000354987.
- Vujosevic M, Blagojevic J (2004) B chromosomes in populations of mammals. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:247-256.

- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr. PM (2001) Molecular organization of 5S rRNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44:839-902.
- White MJD (1973) *Animal cytology and evolution*. Cambridge Univ Press, 961p.
- Wilson E (1907) The supernumerary chromosome of Hemiptera. *Science*, 26:870-871.
- Winemiller K (1996) *Food webs: integration of patterns and dynamics*. Chapman and Hall, New York.
- Yazbeck GM, Kalapothakis E (2007) Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genet Mol Res*, 6:1026-1034.
- 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 Genet*, 7(8):e1002203. doi: 10.1371/journal.pgen.1002203.
- Zhang ZQ (2013) *Animal biodiversity: an update of classification and diversity in 2013*. *Zootaxa*, Auckland, 3703(1):5-11.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution*, 52:274-277.

## 7 APÊNDICES

## 7.1 Apêndice 1

**Apêndice 1.** Tabela da frequência dos cromossomos B descritos nos peixes neotropicais (Capítulo 1). NB = número de Bs, TB = tamanho dos Bs e MB = morfologia dos Bs.

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<b>CHARACIFORMES</b>						
<b>Anostomidae</b>						
<i>Leporinus friderici</i>	Rio Candeias, Porto Velho, RO, BRA	54	1	pequeno	a	Venere et al. (1999)
<i>L. friderici</i>	Rio Araguaia, Barra do Garça, MT, BRA	54	1	pequeno	a	Venere et al. (1999)
<i>L. sp.</i>	Córrego Dois de Agosto, Araguaiana, MT, BRA	54	0-1	pequeno	a	Venere et al. (1999)
<i>Schizodon nasutus</i>	Rio Paraná, Posadas, ARG	54	0-1	micro	-	Pastori et al. (1998)
<b>Characidae</b>						
<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Campo Novo, Bauru, SP, BRA	50	1	pequeno	a	Hashimoto et al. (2008)
<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Alambari, bacia do Paranapanema, Bauru SP, BRA	50	0-1	micro	a	Hashimoto et al. (2011)
<i>A. bockmanni</i>	Rio Alambari, bacia do Paranapanema, Bauru SP, BRA	50	0-2	macro micro	m m	Daniel et al. (2012)
<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Mogi Guaçu, SP, BRA	46	0-1	-	-	Daniel e Almeida-Toledo (1995)
<i>A. fasciatus</i>	Rio São Francisco, Três Marias, MG, BRA	46	1	grande	m	Moreira-Filho et al. (2001)
<i>A. fasciatus</i>	Rio Campo Novo, bacia do Tietê, Bauru, SP, BRA	46	0-1	médio	a	Hashimoto et al. (2011)
<i>Astyanax jordani</i>	Mexico, loja de aquarismo.	50	1	micro	m	Silva et al. (2015)
<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico, loja de aquarismo.	50	1	pequeno	a	Piscor e Parise-Maltempi (2016)
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Córrego Pedra, Campos do Jordão, SP, BRA	50	0-2	grande	m	Salvador e Moreira-Filho (1992)
<i>A. scabripinnis</i>	Rio Jucu, Vitor Hugo, ES, BRA	50	0-4	micro	-	Stange e Almeida-Toledo (1993)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Pedra, Campos do Jordão, SP, BRA	50	1-2	grande	m	Fauaz et al. (1994)
<i>A. scabripinnis</i>	Rio Araquá, bacia do Tietê, Botucatu, SP, BRA	50	1	grande	m	Maistro et al. (1994a)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Pedra, Campos do Jordão, SP, BRA	50	1-2	grande	m	Maistro et al. (1994a)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Piracuama, Paraíba do Sul, SP, BRA	50	1	grande	m	Souza e Moreira-Filho (1995)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Yukatan, bacia do Ivaí, PR, BRA	50	1	grande	m	Mizoguchi e Martins-Santos (1997)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Jataí, Uberlândia, MG, BRA	50	1	pequeno	-	Araújo e Morelli (2000)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Grande, Campos do Jordão, SP, BRA	50	0-2	macro médio	m/sm m	Néo et al. (2000)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Pedra, Campos do Jordão, SP, BRA	50	1-2	macro	m	Moreira-Filho et al. (2001)

## Apêndice 1. Continuação...

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego São Domingos, Maringá, PR, BRA	48	0-1	pequeno	m	Alves e Martins-Santos (2002)
<i>A. scabripinnis</i>	Região de Campos do Jordão, SP, BRA	50	0-2	macro médio	m/sm m	Ferro et al. (2003)
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Tatupeba, bacia do Ivaí, PR, BRA	46	2	grande pequeno	m a	Fernandes e Martins-Santos (2005)
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	Rio Araquá, bacia do Tietê, SP, BRA	50	0-1	macro	m	Maistro et al. (1992)
<i>A. scabripinnis paranae</i>	Rio Cascatinha, bacia do Tietê, SP, BRA	50	0-1	macro	m	Maistro et al. (1994b)
<i>Astyanax paranae</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP, BRA	50	0-1 0-1	macro macro	m sm	Silva et al. (2014)
<i>Astyanax schubarti</i>	Rio Paraná, Misiones ARG	36	1	grande macro	m m	Moreira-Filho et al. (2001)
<i>Astyanax</i> sp. B	Reservatório Salto Caxias, rio Iguaçú, PR, BRA	50	1-2	pequeno micro	sm a	Fazoli et al. (2003)
<i>Hyphessobrycon eques</i>	Rio Ribeirão Claro, SP, BRA	52	0-1	pequeno	st	Piscor e Parise-Maltempi (2015)
<i>Metynnis lippincotianus</i>	Rio Peixe-Boi, Amazônia Oriental, PA, BRA	62	2	-	-	Souza et al. (1999)
<i>Moenkhausia intermedia</i>	Lagoa do Mato, Luis Antonio, SP, BRA	50	0-1	pequeno	-	Portela et al. (1988)
<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Rio Capivara, bacia do Tietê, SP, BRA	50	1-8	micro	-	Foresti et al. (1989)
<i>M. sanctaefilomenae</i>	Rio Aguapey, Corrientes, ARG	50	1-3	micro	-	Alberdi e Fenochio (1997)
<i>M. sanctaefilomenae</i>	Rio Paraná, Porto Rico, PR	50	0-2	micro	-	Portela-Castro et al. (2001)
<i>M. sanctaefilomenae</i>	Rio Batalha, bacia do Tietê, SP, BRA	50	1-8	micro	-	Hashimoto et al. (2012)
<i>Oligosarcus pinto</i> cit. <i>Paroligosarcus pinto</i>	Rio Mogi Guaçu, lagoa Nova, SP, BRA	50	0-1	grande	m	Falcão et al. (1984)
<b>Crenuchidae</b>						
<i>Characidium alipioi</i>	Rio Ribeirão Grande, bacia do Paraíba do Sul, Pindamonhangaba, SP, BRA	50	0-4	pequeno	a	Serrano et al. (2017)
<i>Characidium</i> cf. <i>fasciatum</i>	Córrego Quinta, Itatinga, SP, BRA	50	0-4	pequeno	st/a	Maistro et al. (1998)
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	Rio Passa Cinco, Ipeúna SP, BRA	50	0-1	pequeno	a	Venere et al. (1999)
<i>Characidium gomesi</i> cit. <i>C. cf. fasciatum</i>	Rio Pardo, Botucatu, SP, BRA	50	0-4	pequeno	st/a	Maistro et al. (1998)
<i>Characidium gomesi</i>	Rio Pardo, Botucatu, SP, BRA	50	1-4	pequeno	st/a	Maistro et al. (2004)
<i>C. gomesi</i>	Rio Novo, Avaré, SP, BRA	50	0-4	pequeno	-	Pansonato-Alves et al. (2014)
<i>C. gomesi</i>	Rio Novo, bacia do Parapanema Avaré, SP, BRA	50	0-1	pequeno	st	Pansonato-Alves et al. (2014)
<i>Characidium pterostictum</i>	Rio Betari, Apiai, SP, BRA	50	0-3	pequeno	-	Pansonato-Alves et al. (2014)
<i>Characidium oiticicai</i>	Rio Paraitinguinha, Salesópolis, SP, BRA	50	0-3	pequeno	-	Pansonato-Alves et al. (2014)

## Apêndice 1. Continuação...

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<b>Curimatidae</b>						
<i>Cyphocharax modestus</i> cit. <i>Curimata modesta</i>	Rio Tietê, Águas de São Pedro, SP, BRA	54	1	pequeno	m/sm	Venere e Galetti Jr. (1985)
<i>C. modestus</i>	Córrego Três Bocas, Londrina, PR, BRA	54	1	pequeno	m	Martins et al. (1996)
<i>C. modestus</i>	Rio Mogi Guaçu, Luis Antonio, SP, BRA	54	1	pequeno	m/sm	Venere et al. (1999)
<i>C. modestus</i>	Rio Paranapanema, reservatório de Jurumirim, SP, BRA	54	4	pequeno	-	De Rosa et al. (2007)
<i>C. modestus</i>	Rio Tibagi, PR, BRA	54	0-2	micro	-	Gravena et al. (2007)
<i>Steindachnerina insculpta</i>	Rio Paranapanema, SP, BRA	54	0-2	micro	m	Oliveira e Foresti (1993)
<i>S. insculpta</i>	Rio Tibagi, PR, BRA	54	0-2	micro	-	Gravena et al. (2007)
<b>Erythrinidae</b>						
<i>Erythrinus Erythrinus</i>	Rios Birigui e Guaíra, SP, BRA;	54/53	0-3	micro	-	Bertollo et al. (2004)
<i>E. Erythrinus</i>	Região de Poconé e Barão de Melgaço, BRA	54	0-6	micro	a	Martins et al. (2014)
<b>Parodontidae</b>						
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Passa-Cinco, SP, BRA	54	0-1	grande	m	Falcão et al. (1984)
<i>Parodon nasus</i>	Rio Três Bocas, Londrina, PR, BRA	54	0-4	micro	-	Paula et al. (2017)
<b>Prochilodontidae</b>						
<i>Prochilodus argenteus</i>	Rio São Francisco, Três Marias, MG, BRA	54	0-3	micro	m	Penitente et al. (2015)
<i>Prochilodus brevis</i> cit. <i>Prochilodus cearenses</i>	Barragem Pereira Miranda, CE, BRA	54	0-2	micro	-	Pauls e Bertollo (1990)
<i>Prochilodus costatus</i>	Rio São Francisco, MG, BRA	54	0-1	micro	-	Melo et al. (2017)
<i>Prochilodus lineatus</i> cit. <i>Prochilodus scrofa</i>	Rio Mogi Guaçu, SP, BRA	54	0-5	micro	-	Pauls e Bertollo (1983)
<i>P. lineatus</i>	Rios Mogi Guaçu, Passa-Cinco, Itaqueri e Jacaré Guaçu, reservatório Itaqueri, SP, BRA	54	0-5	micro	-	Pauls e Bertollo (1990)
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi Guaçu e pisciculturas, SP, BRA	54	0-7	micro	m/sm/a	Cavallaro et al. (2000)
<i>P. lineatus</i>	Piscicultura CEPTA ICMBio, SP, BRA	54	0-9	micro	m/sm/a	Voltolin et al. (2011)
<i>P. lineatus</i>	Lagoa Dourada, Ponta Grossa, PR, BRA	54	0-3	micro	-	Artoni e Almeida (2001)
<i>Prochilodus mariae</i>	Caicara Del Orinoco, VEN	54	0-3	pequeno	m	Oliveira et al. (2003)
<i>Prochilodus nigricans</i>	Rio Araguaia, Barra do Garça, MT, BRA	54	0-2	micro	-	Venere et al. (1999)
<b>Serrasalminae</b>						
<i>Metynnis maculatus</i>	Rio Grande, Santa Albertina, SP, BRA	62	0-1	micro	a	Baroni et al. (2009)

## Apêndice 1. Continuação...

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<b>SILURIFORMES</b>						
<b>Auchenipteridae</b>						
<i>Parauchenipterus galeatus</i>	Lagoa marginal ao rio São Francisco, BRA	58	0-2	pequeno	m	Lui et al. (2009)
<b>Callichthyidae</b>						
<i>Callichthys callichthys</i>	Branquinha Arroyo, rio Gravataí	58	0-4	médio	-	Erdtmann et al. (1990)
<i>C. callichthys</i>	Rio Guaíba, PR, BRA	57	0-3	pequeno	m/sm	Erdtmann et al. (1990)
<i>C. callichthys</i>	Lagoa dos Patos, BRA	58	0-16	pequeno	m/sm	Erdtmann et al. (1990)
<i>C. callichthys</i>	Itanhaém, BRA	58	0-5	micro	-	Oliveira et al. (1993)
<i>C. callichthys</i>	Lagoas perto de Reconquista, Santa Fé, ARG	56	0-2	pequeno	m	Sanchez e Fenocchio (1996a)
<i>C. callichthys</i>	Córrego do Pombo, Marília, SP, BRA	56	0-8	micro	-	Shimabukuro-Dias et al. (2005)
<i>C. callichthys</i>	Corumbá, MT, BRA	56	0-1	grande	m	Shimabukuro-Dias et al. (2005)
<i>C. callichthys</i>	Rio Paraná, Guaíra, PR, BRA	56	0-1	médio	a	Konerat et al. (2014)
<i>Corydoras aeneus</i>	Rios Araquá, Corumbataí, Capivara e Alambari, SP, BRA	60	0-3	pequeno	sm/st	Oliveira et al. (1988)
<b>Doradidae</b>						
<i>Ossancora punctata</i>	Rio Miranda, Corumbá, Mato Grosso do Sul, BRA	66	0-3	micro	-	Takagui et al. (2017)
<i>Platydoras armatulus</i>	Rio Miranda, Corumbá, Mato Grosso do Sul, BRA	58	0-3	micro	-	Takagui et al. (2017)
<i>Pterodoras granulatus</i>	Rio Paraná, Pauliceia, São Paulo, BRA	58	0-1	micro	-	Takagui et al. (2017)
<b>Heptapteridae</b>						
<i>Pimelodella kronei</i>	Iporanga, SP, BRA	58	1	micro	-	Almeida-Toledo et al. (1992)
<i>Rhamdia branneri</i>	Reservatório Segredo, Guarapuava, PR, BRA	58	0-4	médio	m/sm	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<i>Rhamdia cf. hilarii</i>	Córregos Hortelã, Quinta e Jacutinga, rios Araquá e Pardo, represa de Jurumirim, SP	58	0-3	médio	m	Vissoto et al. (1999)
<i>R. hilarii</i>	Represa Monjolinho, São Carlos, SP, BRA	58	0-5	pequeno	m	Fenocchio e Bertollo (1990)
<i>R. hilarii</i>	Represa Lobo, Itirapina, SP, BRA	58	0-3	médio	m	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	29 represas, Luiz Antonio SP, BRA	58	0-5	médio	m	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	Rio São Francisco, Três Marias, MG, BRA	58	2	médio	m	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. hilarii</i>	Rio Mogi Guaçu, SP, BRA	58	0-2	médio	m	Maistro et al. (2000)
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Guaíba, lagoa dos Quadros, RS, BRA	58	0-2	médio	m	Hochberg e Erdtmann (1988)
<i>R. quelen</i>	Rio Mogi Guaçu, Luis Antonio, SP, BRA	58	4	médio	m	Fenocchio et al. (2000)
<i>R. quelen</i>	Rio Iguaçu, Porto União, SC, BRA	58	0-1	médio	m	Fenocchio et al. (2000)



## Apêndice 1. Continuação...

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<i>R. quelen</i>	Rio Iguaçu, PR, BRA	58	0-1	pequeno	m	Fenocchio et al. (2003)
<i>R. quelen</i>	Rio Taquarussu, BRA	58	0-4	grande médio	m m	Stivari e Martins Santos (2004)
<i>R. quelen</i>	Serra da Bodoquena, Porto Murtinho, BRA	58	0-3	médio	m/sm	Moraes et al. (2009)
<i>R. quelen</i>	Rio Águas dos Patos, SP, BRA; Águas das Pedras, Londrina, PR, BRA; Rio Taquari, Jataizinho, PR, BRA; piscicultura, Timbó, SC, BRA	58	0-2	médio	m	Moraes et al. (2009)
<i>Rhamdia sapo</i>	Buenos Aires, ARG	58	1	médio	-	Valcarcel et al. (1993)
<i>Rhamdia</i> sp.	Represa Segredo, Guarapuava, PR, BRA	58	0-2	pequeno	a	Abucarma e Martins Santos (2001)
<i>Rhamdia</i> sp.	Córrego Grande, SP, BRA	58	0-4	pequeno	m	Garcia et al. (2003)
<i>Rhamdia voulezi</i>	Represa Segredo, Guarapuava, PR, BRA	58	0-2	médio	m	Abucarma e Martins-Santos (2001)
<b>Loricariidae</b>						
<i>Harttia longipinna</i>	Rio São Francisco, Pirapora, MG, BRA	58	0-2	micro	-	Blanco et al. (2012)
<i>Hisonotus leucofrenatus</i> cit.	Córrego Poço Grande, Juquiá, SP, BRA	54	0-2	grande	m	Ereata et al. (1993)
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>						
<i>H. leucofrenatus</i> cit. <i>M. leucofrenatus</i>	Rio Marumbi, Morretes, PR, BRA	54	0-2	grande	m	Ereata et al. (1993)
<i>Loricaria prolix</i>	Rio Paraná, Porto Rico, PR, BRA	62	0-5	micro	-	Scavone e Júlio Júnior (1993)
<i>Loricaria</i> sp.	Rio Paraná, Porto Rico, PR, BRA	64	1-3	micro	-	Scavone e Júlio Júnior (1993)
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Córrego Tuá, sub-bacia do rio Pirapó e rio Paraná, BRA	56	0-3	pequeno	a	Porto et al. (2010)
<b>Pimelodidae</b>						
<i>Bergiaria westermanni</i>	Rio São Francisco, MG, BRA	56	0-5	pequeno	-	Dias e Foresti (1993)
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Rio Tibagi, Londrina, PR, BRA	56	0-3	micro	-	Carvalho et al. (2004)
<i>I. labrosus</i>	Represa Capivara, Sertanópolis e Porecatu, PR, BRA	56	0-1	micro	-	Carvalho e Dias (2005)
<i>I. labrosus</i>	Represa Jurumirim, SP, BRA	56	0-2	pequeno	a	Vissoto et al. (1999)
<i>Pimelodus ortmanni</i>	Represa Caxias, bacia do Iguaçu, PR, BRA	56	0-4	pequeno	-	Borin e Martins Santos (2004)
<i>Pimelodus</i> sp.	Represa Caxias, bacia do Iguaçu, PR, BRA	56	0-4	pequeno	m/a	Borin e Martins Santos (2004)
<b>Pseudopimelodidae</b>						
<i>Microglanis cottoides</i>	Rio Forquetinha, lagoa dos Patos, RS, BRA	56	0-5	-	-	Gouveia et al. (2013)
<b>Trichomycteridae</b>						
<i>Trichomycterus davisi</i>	Rio Iguaçu, PR, BRA	54	0-2	pequeno	m/a	Borin e Martins-Santos (1997)

## Apêndice 1. Continuação...

Ordem, Família, Espécie	Localidade	2n	NB	TB	MB	Referência
<b>CICHLIFORMES</b>						
<b>Cichlidae</b>						
<i>Cichla monoculus</i>	Lago Balbina, rio Uatumã, AM, BRA	48	1-3	micro	-	Feldberg et al. (2004)
<i>Cichla</i> sp.	Lago Balbina, rio Uatumã, AM, BRA	48	1-3	micro	-	Feldberg et al. (2004)
<i>Crenicichla lepidota</i>	Lagoa dos Patos, RS, BRA	48	0-3	pequeno	-	Pires et al. (2015)
<i>Crenicichla reticulata</i>	Lago Balbina, rio Uatumã, AM, BRA	48	1-3	micro	-	Feldberg et al. (2004)
<i>Gymnogeophagus balzanii</i>	Rio Miranda, MS, BRA	48	0-4	micro	-	Feldberg e Bertollo (1984)
<i>Laetacara</i> cf. <i>dorsigera</i>	Lagoa Guaraná, Garças e Pontal, rio Paraná, BRA	45	0-2	micro	-	Martins-Santos et al. (1995)
<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Araguaia, Mato Grosso, BRA	48	0-3	pequeno	-	Oliveira et al. (2009)
<i>Satanoperca lilith</i>	Arquipélago Anavilhanas, rio Negro, Brasil	48	0-1	pequeno	-	Silva et al. (2016)
<b>BELONIFORMES</b>						
<b>Belonidae</b>						
<i>Strongylura</i> cf. <i>microps</i>	Rio Paraná, Posadas, Misiones ARG	50	0-2	pequeno	-	Pastori et al. (1998)
<b>GYMNOTIFORMES</b>						
<b>Apteronotidae</b>						
<i>Apteronotus</i> prope <i>albifrons</i>	Rios Baía e Ivinhema e lagoas do alto rio Paraná, Porto Rico, PR, BRA	24	1-3	micro	-	Mendes et al. (2012)
<b>SYNBRANCHIFORMES</b>						
<b>Synbranchidae</b>						
<i>Synbranchus marmoratus</i>	Lagoas da bacia do Paraná, Garabato, Santa Fé, ARG	44	0-2	pequeno	m	Sanchez e Fenocchio (1996b)