

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Estudo da herança e manutenção de cromossomos B em
Astyanax paranae através de cruzamentos dirigidos**

CAIO AUGUSTO GOMES GOES

MESTRADO

**Botucatu, SP
2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Estudo da herança e manutenção de cromossomos B em
Astyanax paranae através de cruzamentos dirigidos**

CAIO AUGUSTO GOMES GOES

FÁBIO PORTO-FORESTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção da qualificação em mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Botucatu, SP
2019**

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

Goes, Caio Augusto Gomes.

Estudo da herança e manutenção de cromossomos B em *Astyanax paranae* através de cruzamentos dirigidos / Caio Augusto Gomes Goes. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti

Coorientador: Ricardo Utsunomia

Capes: 20400004

1. Cromossomos humanos 4-5. 2. *Astyanax* (Peixe). 3. Peixe - Reprodução.

Palavras-chave: *Astyanax*; Cromossomos B; Reprodução.

*“Aqueles que ajudam os outros, sem nada
esperar em troca, apenas por que é o certo
a se fazer, merecem verdadeiramente ser
chamados de heróis”*

Stan Lee

***Aos meus pais, Donizeti e Nilva, e a minha companheira pra vida toda,
Karoline. Vocês são a força que me move todos os dias.***

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas e instituições que me ajudaram a realizar este trabalho, e todas elas merecem um agradecimento especial.

A Deus, por todo o caminho até aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio concedido.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, pela formação concedida ao longo de cinco anos incríveis.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

Ao Laboratório de Genética de Peixes, por toda a estrutura e encaminhamento profissional. E por se tornar minha casa.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Genética de Peixes, por todo o apoio oferecido para a construção desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio) e ao Laboratório de Biotecnologia de Peixes, pelo apoio incondicional à este trabalho.

Ao professor Fábio Porto-Foresti, por uma oportunidade única em minha vida. Muito obrigado por sua orientação, seja científica ou sobre a vida, pela confiança, por todo o apoio, pela amizade, por todas as oportunidades e desafios, pelo exemplo e por estar sempre disponível para uma boa conversa. Obrigado por mudar não somente minha vida, mas também a de tantos dos seus alunos. Espero um dia ter uma pequena parte da sua capacidade de lidar com pessoas. Mesmo que eu te agradeça todos os dias daqui em diante, ainda não será o suficiente.

Ao professor Ricardo Utsunomia, por toda a orientação e amizade e também por ser um exemplo de cientista. Você me mostrou o quanto a ciência pode ser prazerosa e recompensadora e espero que você guarde sua passagem por Bauru com tanto carinho quanto eu guardarei.

Ao professor Fausto Foresti, por estar sempre com as portas abertas e por estar disponível para sempre compartilhar de seu vasto conhecimento.

Ao professor George Yasui e ao Pesquisador José Senhorini, por me receberem todo final de ano e por disponibilizarem tanto de seu tempo e trabalho em prol de minha pesquisa. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao pesquisador e amigo Duílio Mazzoni Zerbinatto de Andrade Silva, pelo grande apoio à este trabalho. Muito obrigado por toda sua disponibilidade e conhecimento, além das ótimas histórias e risadas. Obrigado por um mês incrível em terras espanholas.

Ao professor Juan Pedro Camacho, por todos os conselhos e sugestões.

Aos amigos Manolo Penitente e Sandro Natal Daniel, que me colocaram no caminho da citogenética. Nunca esquecerei as lições que me passaram, nem todas as experiências maravilhosas que passamos juntos. Sinto a falta de vocês.

A todos os companheiros do Laboratório de Genética de Peixes, que não são poucos. Fernanda, Diego, Carol, Raul, Cahique, Caio, Lilian, Pedro, Zeni, Yasmin, Mariana, Júlia, Ana Paula, Vinícius, Ana Carolina, Rafael, Ari, Rodrigo, Leonardo e William. Também aqueles que já seguiram seu caminho: Aline, Andreia, Bruna, Faiçall, Flávio, Maíce, Milena, Raquel, Rosângela, Vinícius e Egberto. Passamos mais tempo juntos do que com nossas próprias famílias, então pra mim é um prazer e uma sorte ter encontrado essa nova família. Obrigado por me fazer sentir em casa.

A todos os amigos que fiz por este caminho e que foram de grande ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Mormaço, Silvana, Renato, Nivaldo, Dilberto, Hatus e Gabriel, estejam vocês em Botucatu ou Pirassununga, fica aqui meu muito obrigado.

A todos os meus grandes amigos de Pirajuí: Ewerton, Marcelo, Lucas, Neto, Daniel, Pilpo, Doni e Adolfo. Cada um de vocês chegou exatamente quando eu precisava, e eu não poderia ter pedido amigos melhores. Obrigado por todos os momentos e aventuras que passamos juntos, sejam elas reais ou em uma mesa de RPG. Apesar de cada dia ser mais difícil estarmos juntos, guardo todos vocês no coração.

Aos amigos que fiz ao chegar em Bauru: Raul, Angela, Ana Júlia, Eduardo, Beca, Giovanna, Edgar e Ana Luísa. Muito obrigado por me mostrar que posso ser querido e aceito em lugares em que eu não imaginava.

A toda minha família de modo geral. Obrigado por todo o apoio, mesmo que a contragosto. Saibam que existe um pedacinho de cada um de vocês neste trabalho.

Aos meus sogros, Liene e Daniel, por todo o apoio e acolhimento. Obrigado por me acompanharem e apoiarem esta jornada.

A minha companheira, namorada, melhor amiga e amor pra toda a vida Karoline. Não consigo contar quantas vezes você me ergueu quando caí, quantas vezes compreendeu meus medos e receios e me ajudou a superá-los. Obrigado por ter sempre uma palavra de carinho e esperança. Obrigado por tudo de maravilhoso que compartilhamos até aqui, e saiba que estou ansioso para viver o resto do meu tempo com você. Tudo o que faço e fiz até agora foi por você. Eu te amo muito, você é sempre minha luz no fim do túnel!

E, finalmente, aos meus pais, Donizeti e Nilva. Muito obrigado por tudo que vocês sacrificaram por mim. Muito obrigado pelo apoio incondicional, mesmo que minhas escolhas custem tanto a vocês. A você pai, muito obrigado por me ensinar a ser honesto, trabalhador e por nunca medir esforços por mim. Serei realizado se, um dia, conseguir ser metade do homem que o senhor é. A você mãe, muito obrigado pela interseção e zelo de sempre. Obrigado por ser sempre uma mulher forte que faz de tudo por seu filho. Muito obrigado pelo amor incondicional que vocês sempre me deram. Vocês são meu porto seguro, e o lugar que sempre posso voltar. Amo muito vocês, e espero, um dia, poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim.

RESUMO

A ictiofauna neotropical é uma das mais ricas do mundo, sendo estimada a ocorrência de 9100 espécies de peixes. Dentre estes, o gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) se destaca como um dos mais abundantes em espécies, sendo marcante a presença de cromossomos B neste grupo. Cromossomos B, ou supranumerários, são cromossomos adicionais aos cromossomos padrões do organismo e considerados dispensáveis. A origem destes cromossomos ainda é incerta, sendo os modelos mais aceitos a origem intraespecífica, em que os cromossomos B se originam dos próprios cromossomos da espécie e a origem interespecífica, em que os supranumerários se originariam dos cromossomos de outra espécie próxima através da hibridação. Uma das características que definem os cromossomos B é a sua transmissão que foge dos padrões mendelianos, levando a acumulação ou extinção destes elementos. Em peixes, cromossomos B estão presentes em 113 espécies, sendo a variante presente em *Astyanax paranae* um dos modelos de estudo para o grupo. Esta variante foi diagnosticada como um isocromossomo de origem intraespecífica, e sequencias presentes neste cromossomo também estão presentes nos cromossomos B de outras espécies do grupo, sugerindo uma origem comum. Entretanto, dados em relação à transmissão deste supranumerário ainda não são conhecidos. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi descrever o padrão de transmissão do cromossomo B presente em *A. paranae* através de cruzamentos dirigidos. A transmissão de cromossomos supranumerários revelou ser dependente do sexo do portador nesta população, sendo o índice de transmissão (kb) de 0,439 em cruzamentos onde somente o macho possui cromossomo B; 0,107 em cruzamentos onde apenas a fêmea é portadora de cromossomo B e 0,356 em cruzamentos onde ambos os parentais possuíam supranumerários. Conclui-se que a herdabilidade da variante de cromossomos supranumerários presente na população de *A. paranae* é diretamente dependente do sexo do parental portador, com transmissão neutra pelos machos e eliminação pelas fêmeas na população estudada.

ABSTRACT

The neotropical ichthyofauna is one of the richest in the world, estimated in 9100 fish species. In this group, the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) is considered one of the most abundant in species, being remarkable the presence of supernumerary or B chromosomes in the group. B chromosomes are additional chromosomes to the standard chromosomes and are considered dispensable. These elements are present in plants, animals and fungi and are generally formed by repetitive DNA sequences and fragments of ribosomal and histone genes. The origin of these chromosomes is still uncertain, and the most accepted model intraspecific-related, where the B chromosomes arise from the same chromosomes of the species and the intraspecific origin, although the supernumerary ones would originate from the chromosomes of another related species by hybridization. One of the important characteristics of B chromosomes is related with their transmission, which does not follow Mendelian patterns, leading to the accumulation or extinction of these elements. In fish, B chromosomes are present in 113 species, and the variant present in *Astyanax paranae* is one of the studying models for the group. This variant was diagnosed as an isochromosome of intraspecific origin, and sequences present on this chromosome are also present on the B chromosomes of other related species, suggesting a common origin. However, data regarding the transmission of this supernumerary are still unknown. Therefore, the objective of the present work was to describe the transmission pattern of the B chromosome present in *A. paranae* through directed crosses by in vitro fertilization. Transmission of supernumerary chromosomes revealed be dependent on the carrier's gender, with a transmission rate (kb) of 0.439 in crosses where only the male has a B chromosome; 0.107 at crosses where only the female carries the B chromosome and 0.356 at crosses where both parents had supernumerary. It is concluded that the inheritance of the supernumerary chromosomal variant present in the *A. paranae* population is directly dependent on the sex of the parental carrier, with neutral transmission by males and elimination by females in the studied population.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Aspectos gerais da família Characidae, com foco no gênero <i>Astyanax</i>	14
1.2	Cromossomos B: aspectos gerais.....	16
1.3	Herança de cromossomos B.....	21
1.4	Manutenção dos cromossomos B nas espécies portadoras.....	24
1.5	Cromossomos B em peixes neotropicais: enfoque em <i>Astyanax</i>	25
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Obtenção das matrizes e local de coleta.....	32
3.2	Caracterização dos parentais	34
3.3	Indução das matrizes e métodos de reprodução	34
3.4	Direcionamento dos cruzamentos	36
3.5	Obtenção das amostras e extração de DNA total	39
3.6	Quantificação do DNA	40
3.7	PCR quantitativo (qPCR)	40
3.8	Análise de frequência de cromossomos B na prole.....	42
4	Resultados e Discussão	44
	Artigo	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7	MATERIAIS COMPLEMENTARES	79

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da família Characidae, com foco no gênero *Astyanax*

A região Neotropical abrange a área desde parte do México, Caribe, até o Sul da América do Sul e compreende a fauna de peixes mais rica do mundo, sendo estimada a ocorrência de 9100 espécies, o que corresponde a 27% do total de espécies do grupo no mundo (Reis et al. 2016). Estes números se tornam ainda mais expressivos se considerarmos que toda essa diversidade ocorre em ambientes de águas continentais, que correspondem a apenas 0.03% de toda água do planeta (Vari e Malabarba 1998). Entretanto, o conhecimento da biologia básica de grande parte deste grupo ainda é um grande desafio para a ictiologia, sendo principalmente as espécies de pequeno porte as menos conhecidas. Assim, o desenvolvimento da taxonomia, da ecologia populacional e do conhecimento da biologia reprodutiva são medidas que podem fornecer alternativas mais eficientes de manejo e conservação dessas espécies (Juvonen e Salo 2004; Martins-Queiroz et al. 2008).

A ictiofauna brasileira apresenta-se como um grande recurso natural, sendo conhecidas cerca de 2.481 espécies (Buckup et al. 2007). Diante disso, pode-se considerar que o Brasil apresenta a maior diversidade de peixes neotropicais do mundo, apesar de informações disponíveis sobre a ictiofauna marinha ainda serem escassas, com 1.298 espécies descritas (Menezes et al. 2003).

Dentre as ordens de peixes que formam a ictiofauna neotropical, a ordem dos Characiformes ganha destaque por ser uma das mais abundantes, com pelo menos 2.200 espécies válidas (Fricke et al. 2019). Apesar de representarem grande parte da ictiofauna neotropical, os peixes desta ordem não estão restritos a essa região,

uma vez que também ocorrem na África subsaariana e sul da América do Norte (Moreira 2007). Em geral, os peixes da ordem dos Characiformes ocorrem em ambientes lênticos e lóticos, sendo vários representantes do grupo importantes para pesca esportiva e de subsistência, como os peixes dos gêneros *Brycon*, *Salminus*, *Prochilodus* e *Astyanax* (espécie de pequeno porte), constituindo um importante recurso alimentício.

Inserido neste grupo, o gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) se destaca como um dos mais abundantes em espécies, os quais habitam, principalmente, cabeceiras de pequenos rios e riachos na maioria das bacias hidrográficas brasileiras (Lima 2003). Atualmente, o gênero *Astyanax* é composto por aproximadamente 154 espécies válidas (Eschmeyer e Fong 2017), embora grande parte dessas espécies ainda careça de informações citogenéticas básicas, enfatizando a necessidade de estudos adicionais neste grupo (Daniel et al. 2015).

Até o momento, os estudos citogenéticos têm evidenciado uma extensa variabilidade cariotípica em relação aos números diploides: desde $2n=36$ em *Astyanax schubarti* (Daniel-Silva e Toledo 2001) a $2n=50$ cromossomos em *A. paranae* (Silva et al. 2016). Adicionalmente, quatro grandes “complexos de espécies” foram descritos neste gênero: *A. scabripinnis* (Moreira-Filho, 1991), *A. fasciatus* (Artoni et al. 2006), *A. bimaculatus* (Paiva et al. 2006) e *A. hastatus* (Kavalco et al. 2009). Nestes grupos destaca-se a ocorrência de variabilidade cariotípica significativa, como números diploides distintos, polimorfismos de heterocromatina e regiões organizadoras nucleolares e, adicionalmente, ocorrência de diferentes variantes de cromossomos B em espécies ou populações distintas (Daniel et al. 2015; Hashimoto et al. 2008; Maistro et al. 1992; Mizoguchi and Martins-Santos 1997; Penitente et al. 2015; Silva et al. 2014). Assim, em regiões onde ocorrem

sistemas de rios e riachos, um isolamento geográfico natural entre as populações se estabelece, podendo impedir o fluxo gênico e tornando-as suficientemente divergentes, constituindo, assim, espécies distintas ou mesmo “complexos de espécies” (Reis et al. 2003).

Sendo assim, a variabilidade cariotípica inter e intraespecífica observada no gênero *Astyanax*, sua ampla distribuição geográfica, alta plasticidade fenotípica, grande capacidade adaptativa e rápida especiação (Zanata e Camelier 2009) são fatores que fomentam estudos citogenéticos, biogeográficos, evolutivos e filogenéticos, permitindo o aprofundamento no conhecimento da sistemática e processos evolutivos envolvidos da diversidade do grupo. Além disso, a presença de cromossomos B em diversas espécies deste grupo é bastante relevante para que esses animais tornem-se importantes modelos de estudo para essa característica, sendo fundamentais para um melhor entendimento da dinâmica evolutiva e da estrutura dos supranumerários.

1.2 Cromossomos B: aspectos gerais

O genoma dos eucariotos não é formado somente pelo conjunto dos genes essenciais ao indivíduo, mas também por uma variedade de elementos dispensáveis aos seus portadores, que podem até mesmo não seguir as leis de transmissão mendeliana. Dentre esses, os cromossomos B, ou supranumerários, destacam-se como sendo um dos primeiros elementos dispensáveis descritos, citados pela primeira vez por Wilson (1907). Este tipo de cromossomo está presente em genomas de vários grupos de organismos, correspondendo a cerca de 15% dos eucariotos (Beukeboom 1994).

Existem diversas definições para cromossomos B, tais como: “cromossomos adicionais dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de determinadas populações de uma espécie, provavelmente originados dos cromossomos A, seguindo, entretanto, seus próprios caminhos evolutivos” (Camacho et al. 2000); “cromossomos supranumerários que geralmente são preferencialmente herdados, desviando-se da segregação mendeliana usual” (Houben 2017) ou “cromossomos não essenciais e potencialmente prejudiciais ao indivíduo quando em elevado número de cópias, tendendo a acumular transposons e DNAs repetitivos, frequentemente mostrando herança não-Mendeliana” (Douglas e Birchler 2017). Os cromossomos B vêm sendo objetos de estudo a décadas, tendo como focos principais aumentar a compreensão sobre possíveis mecanismos de origem e manutenção nos diversos grupos em que estão presentes, descrever os vários polimorfismos estruturais e numéricos de cromossomos Bs nas espécies, caracterizar a composição destes elementos através de hibridação *in situ* fluorescente e, mais recentemente, com o sequenciamento de nova geração, seu conteúdo gênico e suas possíveis funções ou prejuízos aos indivíduos, contrastando com sua natureza dispensável, além dos mecanismos de herança e manutenção nas populações que apresentam supranumerários.

A origem dos cromossomos B ainda é incerta, sendo este o principal foco de diversos estudos científicos. Dentre as hipóteses para o surgimento destes elementos, as mais aceitas são: I) a hipótese de origem intraespecífica, que sugere os cromossomos B como derivações dos cromossomos do conjunto padrão A, sendo considerados subprodutos da evolução do cariótipo padrão (Camacho et al. 2000; Jones e Rees 1982; Teruel et al. 2010) e II) a hipótese de origem interespecífica, que sugere que os cromossomos B de uma espécie podem ser

originados dos cromossomos padrão de outra espécie proximamente relacionada, por hibridação (Battaglia 1964; Camacho et al. 2000; McAllister e Werren 1997; Scharl et al. 1995; Tosta et al. 2015).

Diversos trabalhos sustentam essas duas hipóteses iniciais. Para a origem intraespecífica, a primeira evidência observada em favor dessa teoria foi observada por (Keyl e Hägele 1971) na análise de cromossomos B do mosquito *Chironomus plumosus*, através da demonstração de um padrão de bandamento presente no cromossomo B muito similar ao encontrado no quarto par de cromossomos, próximo ao centrômero. Estudos moleculares recentes têm sido de grande importância no estudo da origem de cromossomos B e têm gerado evidências que apoiam a origem intraespecífica, como é o caso da análise das sequências repetitivas presentes no cromossomo B da planta *Crepis capillaris* (Jamilena et al. 1994; 1995). Neste caso, todas as sequências repetitivas isoladas do cromossomo supranumerário também se encontram nos cromossomos padrão da espécie.

Em peixes, algumas variações de cromossomos B com origem intraespecífica são observadas. Mestriner et al. 2000, Jesus et al. 2003 e Artoni et al. 2006 sugerem o surgimento dos cromossomos B pelo processo de isocromossomo para algumas espécies de Characiformes. Por exemplo, a variante de cromossomo supranumerário encontrada em *Astyanax scabripinnis* foi diagnosticada como um isocromossomo através do mapeamento da sonda As51 por Mestriner et al. 2000, que revelou a presença das sequências repetitivas em ambos os braços do cromossomo B de modo similar ao par 24 do cariótipo padrão, gerando argumentos favoráveis a origem do cromossomo B pela formação de um isocromossomo. Posteriormente, Silva et al. 2014 observaram o mesmo fenômeno em *Astyanax paranae* através do mapeamento das sondas 18S e histona H1. No entanto, deve-se

destacar que embora ambos os cromossomos reportados acima sejam bastante parecidos do ponto de vista morfológico, as sequências repetitivas mapeadas são completamente diferentes (Mestriner et al. 2000; Silva et al. 2014).

A origem interespecífica dos cromossomos supranumerários é uma alternativa ao modelo anteriormente apresentado e foi demonstrado ocorrer em linhagens de vespas híbridas entre as espécies *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti* (Perfectti e Werren 2001). Ainda, o cromossomo B presente no peixe ginogenético *Poecilia formosa* resultante do cruzamento entre *Poecilia mexicana* e *Poecilia latipinna* é outro exemplo originado por hibridação entre espécies (Schartl et al. 1995). Neste caso, o material genético presente nos espermatozoides apenas é utilizado para o início do desenvolvimento embrionário, sendo subsequentemente eliminado durante a formação do zigoto. Sendo assim, os cromossomos supranumerários presentes seriam produto de uma eliminação incompleta dos cromossomos A do parental masculino (Schartl et al. 1995). Em abelhas do gênero *Partamona*, uma sequência específica dos cromossomos B sugerem a possibilidade de origem interespecífica. A análise em quatro diferentes espécies revelou uma escassez em divergências nesta sequência, sugerindo a possibilidade deste cromossomo B ter sido transferido recentemente através de episódios de hibridação interespecífica (Tosta et al. 2015).

A presença dos cromossomos B nos organismos é notável pelo intenso polimorfismo estrutural e numérico observado nestes elementos, envolvendo sua composição, morfologia e número de cromossomos por indivíduo. Uma classificação para os cromossomos B através de sua morfologia foi proposta por Volobujev (1984), em que os cromossomos são divididos em três grupos: no primeiro grupo se enquadram os cromossomos B cujo tamanho é inferior aos menores cromossomos

do conjunto padrão. Neste caso, os cromossomos podem ser chamados de microcromossomos. No segundo grupo reúnem-se os cromossomos B com tamanho equivalente aos cromossomos A e no terceiro grupo enquadram-se os supranumerários cujo tamanho é superior aos maiores cromossomos do cariótipo padrão (Volobujev 1984).

Na maioria das espécies em que estão presentes, a transmissão mitótica dos cromossomos B é normal e todas as células carregam o mesmo número destes elementos (Houben et al. 2013). Entretanto, alguns exemplos de supranumerários que apresentam instabilidade mitótica podem ser notados, resultando em células com diferentes números de cromossomos B. Esta variação é resultado de não disjunções das cromátides irmãs durante a mitose, levando a ausência de cromossomos B em uma das células-filhas produzidas e seu acúmulo na outra célula-filha (Houben et al. 2013). Além disso, são registrados exemplos de organismos em que os cromossomos B estão restritos a órgãos ou tecidos específicos, como é o caso na planta *Aegilops mutica*, em que os cromossomos supranumerários existem na porção aérea do organismo, mas estão ausentes nas raízes (Ohta 1996). Em gafanhotos, essa variabilidade numérica dos cromossomos B é encontrada especificamente nos folículos dos testículos (Nur 1969).

Por representar um segmento de DNA sem a presença de genes essenciais ao portador, discute-se que os cromossomos B são dispensáveis, estando livre para sofrer mutações sem prejuízo aos hospedeiros. Sendo assim, é comum a presença de polimorfismos estruturais entre espécies ou populações. Polimorfismos estruturais são bem documentados em plantas, incluindo as espécies *Brachycome dichromosomatica* (Houben et al. 1999), *Scilla autumnalis* (Parker et al. 1991), *Allium schoenoprassum* (Bougourd e Parker 1979) e *Aegilops speltoides* (Belyayev e

Raskina 2013), e também está presente em animais, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Bakkali et al. 1999; Cabrero et al. 1999).

A composição dos cromossomos B foi amplamente investigada através do uso de citogenética molecular clássica, o que levou a um marco histórico que embasa as pesquisas atuais com este elemento (Ahmad e Martins 2019). Estes estudos baseavam-se no uso de sondas de DNA repetitivo como ferramenta para a descoberta da localização de sequências específicas nos cromossomos supranumerários. Como resultado, conclui-se que os cromossomos B são ricos em diversos DNAs repetitivos nas diferentes espécies estudadas, incluindo elementos repetitivos arranjados em *tandem* (Potapov et al. 1990), LINEs e SINEs (Peppers et al. 1997), sequências teloméricas (Szczerbal e Switonski 2003; Wurster-Hill et al. 1988), clusters de DNA ribossomal (Rubtsov et al. 2004; Stitou et al. 2000) e genes de histonas (Yang et al. 1997). Embora muito tenha sido feito para descobrir o conteúdo repetido do DNA, a exploração recente e futura de genes codificadores de proteínas e sequências de RNA não codificantes em Bs atenderá às demandas de compreensão de sua enigmática origem evolutiva (Ahmad e Martins 2019).

1.3 Herança de cromossomos B

Uma das principais características dos cromossomos B é o seu comportamento não mendeliano, provavelmente devido ao seu não pareamento ou recombinação com os cromossomos do complemento A durante a meiose. Algumas das raras exceções a essa regra são observadas em centeio e milho, casos nos quais translocações entre cromossomos A e B podem ser observadas (Auger e Birchler 2002; Pohler e Schlegel 1990). Durante a meiose de cromossomos

autossômicos homólogos, ocorre a formação de bivalentes que se segregam na primeira divisão, fato normalmente inexistente em cromossomos B. Desta forma, a invasão dos cromossomos B e sua manutenção nos genomas poderiam ser resultado desse comportamento individual do tipo univalente (Camacho 2005). Ao invés de se dividirem de acordo com o modelo mendeliano, univalentes são livres para segregar-se a um polo meiótico específico, resultando em uma transmissão maior que a mendeliana (Camacho 2005).

A variação no padrão de transmissão dos cromossomos B é um aspecto comum na herança, na qual, a forma que estes são perdidos em algumas progênes e aumentada em número em outras é sempre comparada à expectativa mendeliana (Chiavarino et al. 1998). Devido à irregularidade quanto ao comportamento meiótico, cromossomos B apresentam uma forte tendência acumulativa, fatos já observados em diversos organismos, como em *Lillium callosum*, no qual a acumulação ocorre principalmente quando a fêmea é portadora de pelo menos 1B em seu genoma, resultando em progênes com 80% de indivíduos portadores de cromossomos B (Kimura e Kayano 1961).

Quando a transmissão dos cromossomos B é maior do que 0,5, fugindo do índice de transmissão postulado por Mendel na lei de segregação igual, a vantagem obtida em sua transmissão é denominada “drive” (Houben 2017), e indica que o cromossomo B pode se acumular nas populações durante as gerações. Apesar dos cromossomos B comumente apresentarem algum grau de “drive” (Jones 1991), pouco se conhece sobre os mecanismos celulares e moleculares que possibilitam a acumulação dos supranumerários. Cromossomos B com capacidade de acumulação são documentados em centeio (Hasegawa 1934), em que há uma não-disjunção das cromátides irmãs dos cromossomos B, resultando em migração de ambas para o

polo generativo durante a formação do grão de pólen. Posteriormente, observou-se que a capacidade acumulativa deste cromossomo B devia-se a presença de uma região controladora do processo de não disjunção denominada NCR na porção final do braço longo do cromossomo B (Houben et al. 2017), sendo que as variantes de supranumerário que não apresentavam essa região passavam por disjunção normalmente durante a anáfase durante a formação dos grãos de pólen (Endo et al. 2008; Håkansson 1959; Müntzing 1945, 1948).

Especificamente em peixes, Oliveira et al. (1997) e Voltolin et al. (2010) realizaram estudos sobre os mecanismos envolvidos na herança dos cromossomos B no curimatã (*Prochilodus lineatus*), constatando que a taxa de transmissão destes cromossomos foi consistente à expectativa de seu comportamento regular meiótico, sugerindo que essas variantes encontravam-se em estado de neutralização. Assim, para que possam reiniciar seu ciclo de invasão, estes elementos devem sofrer mutações em suas sequências de DNA para que uma nova variante surja; caso contrário, estes elementos devem seguir rumo à extinção por eventos aleatórios, resultando no desaparecimento do cromossomo B da população (Camacho et al. 2000). Posteriormente, Penitente et al. 2013, 2015 observaram um *drive* diferente para cada variante de cromossomos B encontrado em *P. lineatus*, sendo a variante metacêntrica a única a possuir taxa de transmissão neutra, enquanto as variantes submetacêntrica e acrocêntrica apresentaram um valor de transmissão abaixo do índice mendeliano ($<0,5$), indicando uma possível extinção destas variantes ao longo do tempo na população analisada.

1.4 Manutenção dos cromossomos B nas espécies portadoras

A manutenção dos cromossomos supranumerários nas populações portadoras é um tópico amplamente debatido, tendo em vista a natureza não essencial deste elemento. Sendo assim, dois modelos foram propostos visando explicar como os cromossomos B são mantidos durante as gerações: o modelo heterótico (White 1977) e o modelo parasítico (Camacho et al. 2000). No modelo heterótico, assume-se que o cromossomo b tem um impacto positivo no *fitness* do organismo portador quando não há acumulação. Sendo assim, este elemento é mantido através das gerações devido ao equilíbrio estabelecido entre os efeitos positivos dos cromossomos supranumerários e os efeitos negativos do mesmo quando presente em números altos (White 1977). Já no modelo parasítico, a manutenção dos cromossomos B seria resultado do equilíbrio entre seus mecanismos de acumulação, que aumentam a frequência dos cromossomos B, e seus efeitos prejudiciais ao *fitness* do portador, que diminui a frequência dos supranumerários (Camacho et al. 2000). Um exemplo bem documentado de cromossomo B compatível com o modelo heterótico ocorre na planta *Allium schoenoprasum*, onde observa-se as plantas portadoras de cromossomos supranumerários com melhor capacidade de adaptação aos ambientes naturais, devido ao cromossomo B aumentar a taxa de germinação de sementes sob condições secas (Holmes e Bougourd 1989; Plowman e Bougourd 1994).

Em relação aos cromossomos B com comportamento parasita, Camacho et al. 2000 desenvolveram um modelo para o ciclo de vida desses elementos. O ciclo de vida dos cromossomos B se inicia como uma variante parasítica com mecanismos que lhe permitem a acumulação, ou “*drive*”, facilitando seu estabelecimento nas populações. A próxima etapa deste ciclo consiste na neutralização deste supranumerário, através da evolução do genoma dos

portadores, tornando-os mais tolerantes aos cromossomos B e a neutralização de seus mecanismos de acumulação. O cromossomo B em estagio neutro, sem métodos de acumulação, segue um caminho evolutivo aleatório, que provavelmente o levará ao desaparecimento na população. Entretanto, devido a sua natureza dispensável, o cromossomo B neutralizado pode sofrer alguma mutação que lhe devolva a capacidade de se acumular, gerando uma nova variante que reinicia o ciclo.

O surgimento de novas variantes de cromossomos B foi detectado no gafanhoto *E. plorans*, que possui supranumerários bastante mutáveis (Cabrero et al. 1999). A frequente geração de novas variantes de cromossomos B indica que o polimorfismo destes elementos genômicos é uma característica comum nas populações portadoras (López-León et al. 1992), possuindo cada variante um *drive* distinto, aumentando a média de cromossomos B por indivíduo ao longo do tempo (Camacho et al. 1997).

1.5 Cromossomos B em peixes neotropicais com ênfase no gênero *Astyanax*

Atualmente, cromossomos B são reportados em 113 espécies de peixes (D'Ambrosio et al. 2017), dos quais 38 são peixes neotropicais. A primeira descrição de cromossomos B em peixes neotropicais ocorreu na espécie *P. lineatus*, (Pauls e Bertollo 1983). Desde então, o número de descrições de supranumerários em espécies da ictiofauna neotropical vem crescendo de maneira exponencial, o que se relaciona com o aumento do interesse nessa problemática e a expansão dos grupos de pesquisa em citogenética de peixes.

A diversidade de cromossomos B observada na ictiofauna neotropical inclui polimorfismos relacionados ao tamanho desses cromossomos, onde se observa a presença de macrocromossomos em algumas espécies do gênero *Astyanax* (Daniel et al. 2012; Silva et al. 2014; 2016), cromossomos supranumerários de tamanho intermediário, como as variantes observadas em *Rhamdia* (Fenocchio e Bertollo 1990; Fenocchio et al. 2000) e microcromossomos, como os presentes em *Prochilodus* (Cavallaro et al. 2000; Pauls e Bertollo 1983, 1990; Penitente et al. 2013; Venere et al. 1999) e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al. 1989; Utsunomia et al. 2016). A frequência de cromossomos supranumerários também é um fator variante em peixes neotropicais, podendo se alterar entre populações de uma mesma espécie ou até mesmo intraindividualmente, como observado em *M. sanctaefilomenae*, em que o número de cromossomos B por célula pode variar de zero a oito cromossomos em um único indivíduo (Foresti et al. 1989; Utsunomia et al. 2016). Apesar do padrão mais comumente encontrado em peixes neotropicais ser de apenas um cromossomo B por indivíduo, observa-se dois microcromossomos B em *Steindachnerina insculpta* (Oliveira 1993) e até mesmo dezesseis microcromossomos B em *Callichthys callichthys* (Erdtmann et al. 1990).

Ao considerar apenas o gênero *Astyanax*, pode-se descrever a incidência destes elementos em pelo menos doze espécies: *A. fasciatus* (Moreira-Filho et al. 2001), *A. lacustris* (Hashimoto et al. 2008), *A. scabripinnis* (Maistro et al. 1994), *A. bockmanni* (Daniel et al. 2012), *A. schubarti* (Moreira-Filho et al. 2001), *A. mexicanus* (Kavalco e Almeida-Toledo 2007), *A. goyacensis* (Santos et al. 2013); *A. paranae* (Abelini et al. 2014; Silva et al. 2016); *A. scabripinnis paranae* (Maistro et al. 1992); *A. sp. B* (Fazoli et al. 2003) e *A. eigenmanniorum* (Torres-Mariano e Morelli 2008). Em relação às morfologias que os cromossomos B podem apresentar em *Astyanax*,

a variante metacêntrica, similar ao maior cromossomo do complemento A, é a que tem apresentado maior recorrência, embora a composição de sequências repetitivas nestes cromossomos seja bastante variável (Mestriner et al. 2000; Moreira-Filho et al. 2001; Silva et al. 2014, 2016). As variantes submetacêntrica e acrocêntrica representam ocorrências mais raras, restritas apenas a determinadas populações de algumas espécies (Moreira-Filho et al. 2004, Daniel et al. 2012, Kavalco e Almeida-Toledo 2007, Hashimoto et al. 2008).

A espécie *Astyanax paranae* é inserida no “complexo de espécies” *A. scabripinnis* (Moreira-Filho 1991) e os indivíduos coletados na bacia hidrográfica do rio Tietê, na região de Botucatu-SP podem apresentar um cromossomo B do tipo macro metacêntrico (Porto-Foresti et al. 1997; Silva et al. 2014, 2016). Em estudo pioneiro, observou-se que a frequência de cromossomos B observada nesta população é de cerca de 40% (Porto-Foresti et al. 1997), Além disso, diferenças nas frequências dos cromossomos B entre fêmeas (57,1%) e machos (8,7%) também foram observadas nesta população (Porto-Foresti et al. 1997). Mais recentemente, uma caracterização estrutural mais significativa deste elemento supranumerário permitiu a detecção e análise de sequências de sítios de 18S rDNA e histona H1, nos mesmos sítios nos dois braços deste cromossomo, definindo esta variante como um isocromossomo (Silva et al. 2014). Finalmente, a pintura cromossômica utilizando um sonda b-específica revelou o compartilhamento de sequências entre os cromossomos B de três espécies de *Astyanax* (*A. paranae*, *A. fasciatus* e *A. bockmanni*), sugerindo uma origem comum destes elementos no gênero (Silva et al. 2016).

A aplicação de técnicas de sequenciamento de nova geração para o estudo dessa variante presente em *A. paranae* tem gerado dados genômicos significativos

relacionados ao conteúdo deste cromossomo supranumerário, inclusive com a detecção de genes de cópia única neste elemento, tornando-a um modelo para o estudo de cromossomos supranumerários em *Astyanax* (Silva et al. em preparação). No entanto, deve-se destacar que informações relacionadas aos mecanismos de herança deste sistema de cromossomo B são inexistentes, sendo impossível verificar a presença de um mecanismo de acumulação ou eliminação deste supranumerário.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar os padrões de herança e transmissão dos cromossomos B presentes nesta população, por meio da realização de cruzamentos dirigidos entre indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B por fertilização *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- 1)** Verificar o comportamento evolutivo do cromossomo supranumerário e sua manutenção na espécie *Astyanax paranae*;
- 2)** Estabelecer a reprodução *in vitro* para *Astyanax paranae*;
- 3)** Avaliar a taxa de frequência e acumulação dos supranumerários em cada prole resultante dos cruzamentos propostos;
- 4)** Avaliar se há relação entre o sexo do parental portador de cromossomo B e sua taxa de transmissão para a prole;
- 5)** Gerar dados sobre o padrão de transmissão destes cromossomos B em machos e fêmeas da espécie *A. paranae*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das matrizes e local de coleta

Setenta exemplares de *A. paranae* provenientes da população localizada no córrego Cascatinha (22°53'22.5"S, 48°29'22.4"W), na cidade de Botucatu, São Paulo foram amostrados de acordo com normativas dos órgãos competentes: MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO – 18884-1, com registro no IBAMA nº 2567470. O córrego Cascatinha faz parte da bacia hidrográfica do Rio Tietê. Esta população foi selecionada devido a grande incidência de cromossomos B em seus integrantes, sendo observados aproximadamente 40% de indivíduos portadores de supranumerários (Porto-Foresti et al. 1997). Além disso, a incidência em machos e fêmeas é divergente, sendo as frequências 8,7% e 57,1% de indivíduos portadores, respectivamente (Porto-Foresti et al. 1997).

A frequência significativa de animais portadores de supranumerários torna essa população ideal para a coleta de exemplares que formarão o banco de matrizes proposto neste trabalho. Para o desenvolvimento deste plantel, buscou-se a coleta de um número significativo de animais portadores e não portadores de cromossomos B, visando realizar cruzamentos que reproduzam as possibilidades de ocorrência na natureza.

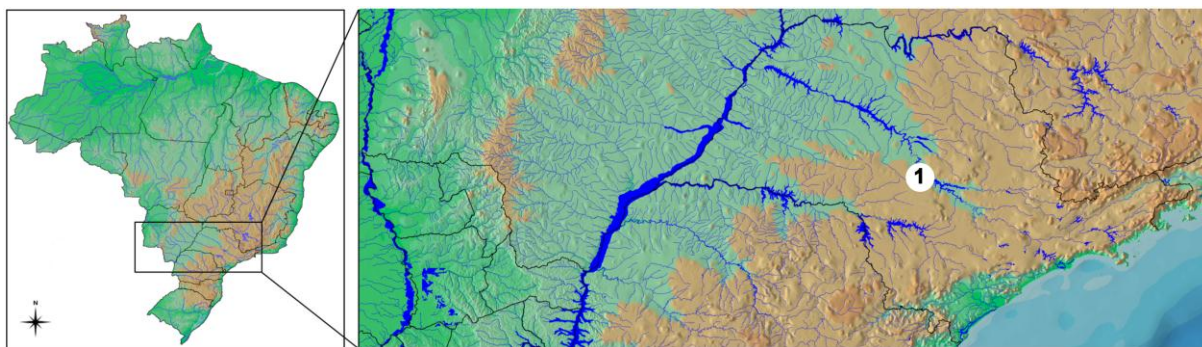


Figura 1: Localização do Córrego Cascatinha, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Os exemplares de *A. paranae* foram capturados sob autorização do MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO, e registro do IBAMA nº 2567470, utilizando-se de redes manuais e armadilhas de espera. Após a captura, os animais foram transportados até o CEPTA-ICMBio (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), e foram mantidos nos aquários de sistema fechado do Laboratório de Biotecnologia de Peixes.



Figura 02: Coleta das matrizes no Córrego Cascatinha (a). As matrizes foram alocadas em caixas de transporte (b) e levadas aos tanques de cultivo do CEPTA-ICMBio (c).

3.2 Caracterização dos parentais

A identificação do sexo dos animais coletados foi realizada através de espículas na nadadeira anal (Garutti 1990). Foram realizadas coletas de tecido para o processo de identificação dos animais portadores de cromossomos B. Esse processo de identificação foi feito inicialmente através de citometria de fluxo (Xavier et al. 2017), comparando a amostra de DNA diploide das matrizes com amostras de DNA haploide obtidas de sêmen de *A. lacustris*. Posteriormente, aplicou-se a técnica de qPCR, utilizando DNA total dos exemplares parentais e um marcador B-específico desenvolvido por Silva et al. (em preparação). Esta técnica possibilita a verificação de animais portadores de zero, um ou dois cromossomos B. Após esta triagem inicial, os animais foram separados em dois grupos: parentais com ausência de B e parentais com um cromossomo B. Destaca-se que a utilização de parentais com 2 cromossomos B não foi considerada por estes serem muito raros de se observar na natureza (Silva, comunicação pessoal).

3.3 Indução das matrizes e métodos de reprodução

O procedimento de reprodução foi realizado com o auxílio do Laboratório de Biotecnologia de Peixes localizado no CEPTA-ICMBio. Devido à ausência de um protocolo específico para a espécie *A. paranae*, as reproduções seguiram os protocolos estabelecidos para *A. lacustris* (Baldiasserotto 2005). Os cruzamentos foram realizados através dos métodos de reprodução seminatural ou fertilização artificial, através da extrusão dos gametas. As técnicas consistem na obtenção dos

gametas, fertilização e manutenção das progênes. Para a reprodução induzida, as matrizes foram induzidas com Ovopel (3 mg kg^{-1} para machos e fêmeas) e transferidas para aquários de 600 L, com temperatura constante de 28°C (Yasui et al. 2015). Ao ser observado o comportamento reprodutivo característico (natação acelerada e movimentos ascendentes na coluna d'água), os peixes foram transferidos para solução anestésica de óleo de cravo (100 mg.L^{-1}), visando manter seu bem-estar durante os procedimentos experimentais. Amostras de sêmen foram coletadas e transferidas para macrotubos de 1,5 mL contendo $300\mu\text{L}$ de solução de Ringer modificada, seguindo a metodologia definida por Yasui et al. 2015. Em seguida, oócitos foram coletados através de extrusão e divididos em alíquotas em placas de Petri coberta com filme plástico PVC. Posteriormente, para a fertilização, para cada alíquota de oócitos, foram adicionados $50 \mu\text{L}$ de sêmen diluído. Os gametas foram ativados com a adição de 3 mL de água destilada e homogeneizados por aproximadamente um minuto, correspondendo ao tempo aproximado de motilidade espermática.

A indução das matrizes para a reprodução seminatural foi similar à utilizada no método de reprodução induzida. A seguir, as matrizes foram transferidas para aquários de sistema fechado separadas nos casais de interesse. Os embriões resultantes dos cruzamentos foram recolhidos após um período de 12 horas. Os embriões resultantes de cada cruzamento foram alocados em recipientes plásticos, os quais foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada de 27°C até a sua eclosão.

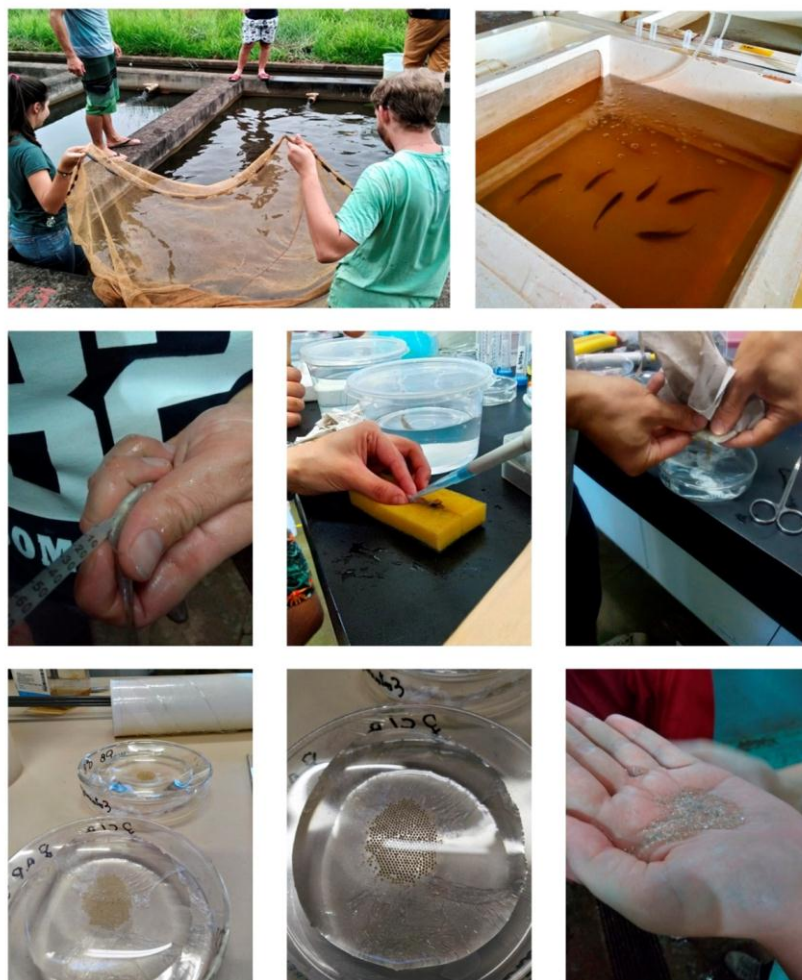


Figura 3: Captura dos animais nos tanques de cultivo (a) e alocação em caixas para a reprodução seminatural (b). As matrizes passaram por indução a reprodução utilizando aplicação de hormônios (c). Para a reprodução induzida, foram coletados os espermatozoides (d) e oócitos (f) e a fertilização ocorreu em placas de Petri (g, h).



Figura 4: Alocação dos embriões em incubadoras, separados por redes de proteção.

3.4 Direcionamento dos cruzamentos

Os cruzamentos foram direcionados visando cobrir todas as possibilidades que podem ocorrer em ambiente natural. Foram realizados quatro combinações para o estudo da herança do cromossomo supranumerário. O cruzamento 1 foi realizado utilizando parentais não-portadores de supranumerários, sendo este um cruzamento controle para a validação da técnica utilizada.

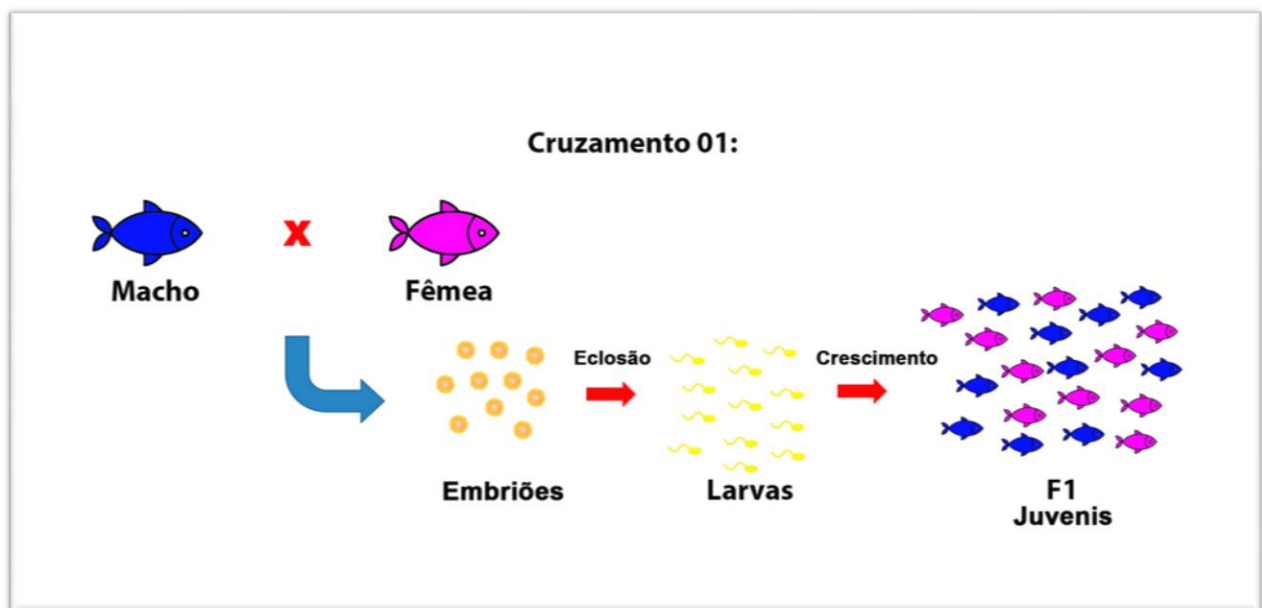


Figura 5: Cruzamento 1, utilizando parentais não-portadores de supranumerários

O cruzamento 2 foi realizado utilizando um macho portador de supranumerário e uma fêmea não-portadora, visando verificar o padrão de herança do cromossomo supranumerário quando apenas o parental masculino é portador.

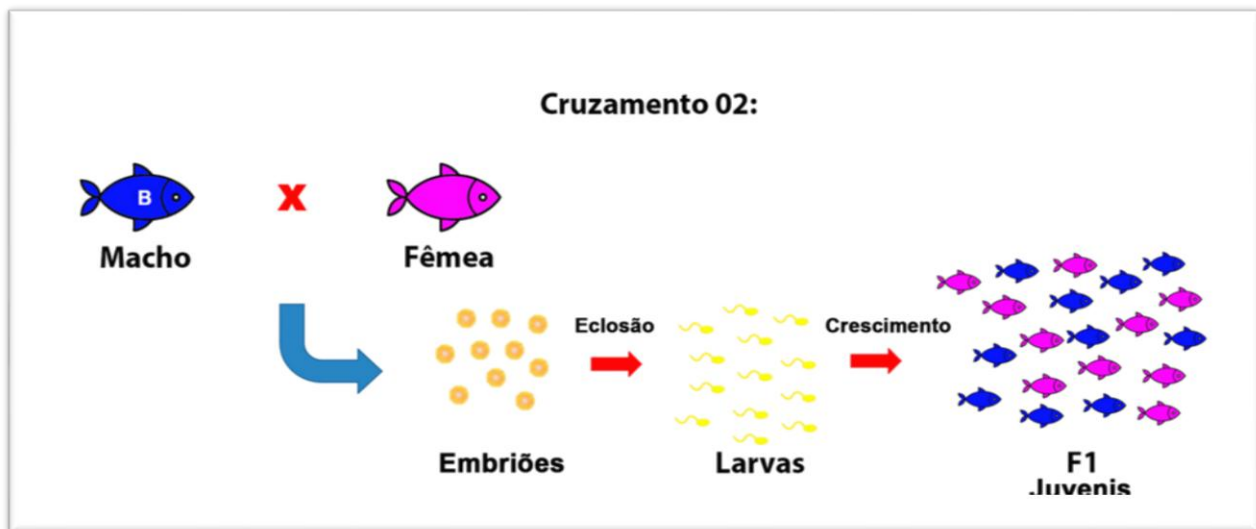


Figura 6: Cruzamento 2, utilizando um macho portador de supranumerário e uma fêmea não-portadora.

O cruzamento 3 foi realizado utilizando um macho não-portador de cromossomo B e uma fêmea portadora, visando verificar o padrão de herança do cromossomo supranumerário quando apenas o parental feminino é portador.

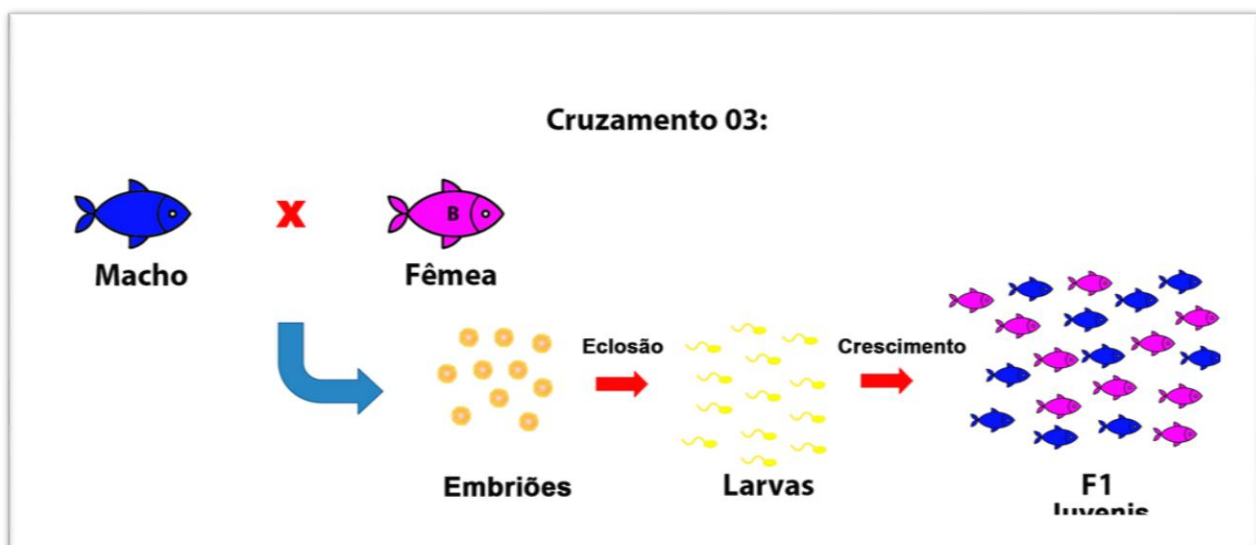


Figura 7: Cruzamento 3, utilizando uma fêmea portadora de supranumerário e um macho não-portador

O cruzamento 4 foi realizado utilizando um macho e uma fêmea portadora de supranumerários, visando observar o padrão de herança do cromossomo B enquanto ambos os parentais são portadores, bem como a ocorrência de indivíduos portadores de dois cromossomos supranumerários, já que estes são raros na natureza.

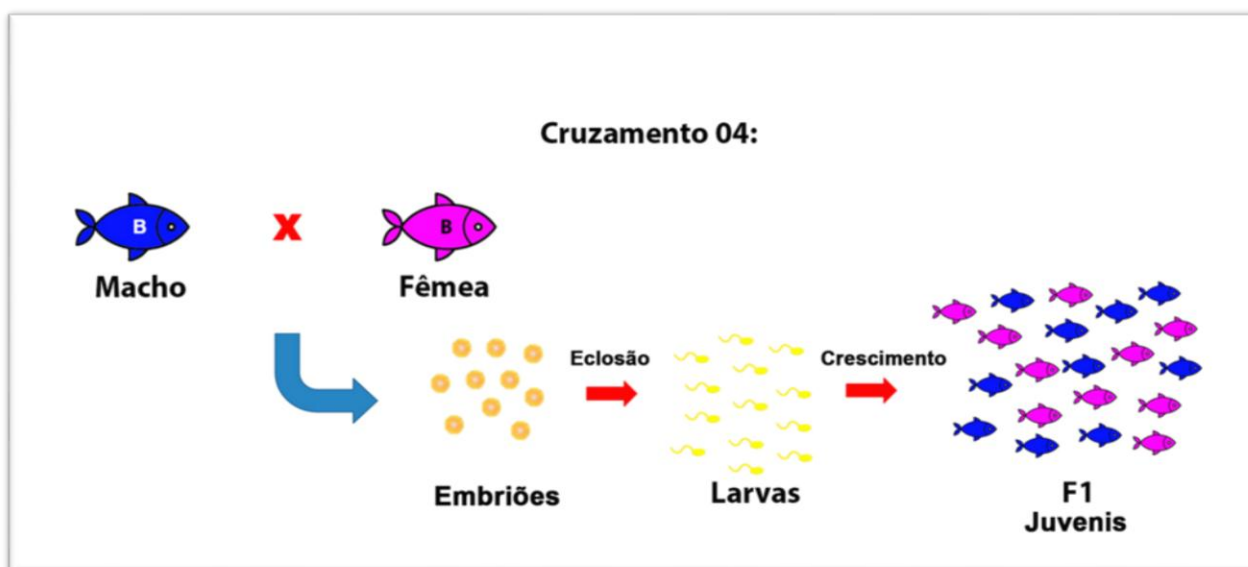


Figura 8: Cruzamento 4, com ambos os parentais sendo portadores de supranumerários.

Dessa forma, foi possível verificar as taxas de transmissão individuais de cada cruzamento e compará-las, a fim de verificar se foi observada alguma diferença e se fatores como o sexo do parental portador de cromossomo B podem influenciar em sua transmissão.

3.5 Obtenção das amostras e extração de DNA total

Durante as reproduções, quatro tipos de amostras foram coletados: fragmentos de nadadeiras caudais das matrizes utilizadas, larvas recém-eclodidas e larvas com três dias de desenvolvimento, além de embriões que não concluíram seu desenvolvimento, resultando em não eclosão. Todos estes tecidos foram fixados em álcool absoluto para a posterior extração de DNA, a fim de verificar a presença de cromossomos supranumerários nas matrizes e nos indivíduos da prole.

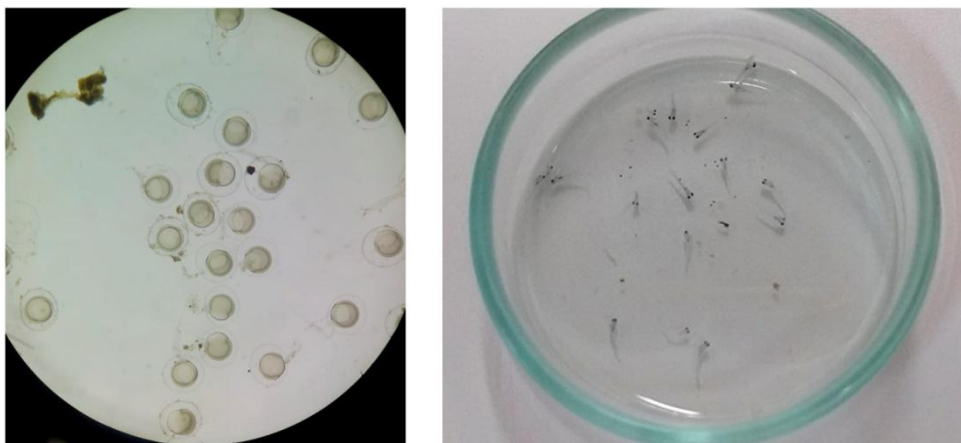


Figura 9: Embriões observados em microscópio (a) e larvas fixadas em álcool absoluto (b.)

O DNA genômico total da espécie *A. paranae* foi isolado com kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, conforme orientações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi observada em eletroforese de gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/mL), visualizadas em um transluminador sob luz ultravioleta (UV) e fotogradadas com câmera Olympus C-5060. Para a quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso e concentração moleculares conhecidos (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen), configurando um padrão de banda que permitiu inferir que o DNA extraído era de boa qualidade.

3.6 Quantificação do DNA

Para o funcionamento adequado do PCR quantitativo em tempo real, é necessário que todas as amostras estejam padronizadas em relação a sua quantidade de moléculas de DNA por microlitros. Dessa forma, todas as amostras foram padronizadas em até 10 nanogramas de DNA por microlitro através do

equipamento NanoDrop 2000c Spectrophotometer, seguindo as orientações do fabricante (Desjardins e Conklin 2010).

3.7 PCR quantitativo (qPCR)

A sigla qPCR significa PCR quantitativa, traduzida do inglês *quantitative PCR*. Isto porque a metodologia permite a quantificação do alvo durante o processo de amplificação do DNA (Cavalcanti e Gomes 2008). Esta metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação das amostras, dando uma maior precisão e confiabilidade aos resultados (Mackay 2004). Além disso, na qPCR o resultado pode ser visualizado imediatamente, dispensando a eletroforese. Isto só é possível devida à adição de marcadores fluorescentes às reações de PCR. Assim, à medida que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente, permitindo determinar com precisão a quantidade de DNA-alvo presente na amostra original.

Neste trabalho, quantificaram-se os genes *sbno* e/ou *nusap*, sabidamente presentes no cromossomo B de *A. paranae* (Silva, em preparação) em comparação ao gene *hprt* exclusivo dos cromossomos padrões da espécie. Para a efetivação da quantificação, foi utilizado o kit comercial Power SYBR® Green PCR Master Mix e placas MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, de acordo com as orientações do fabricante, associado ao marcador fluorescente SybrGreen I, que se liga de maneira aleatória ao DNA. A fluorescência é emitida à medida que a dupla fita de DNA é formada devido à concentração do corante entre as novas cadeias de DNA geradas. Ao final, a comparação entre a quantificação dos genes alvo é medida

(RQ). Quanto maior este valor, maior a diferença entre a quantidade final dos produtos amplificados. Sendo assim, altos RQs estabelecem uma diferença significativa na quantidade final dos genes amplificados, indicando a presença de um cromossomo B. A identificação por qPCR dos indivíduos segue o protocolo definido por Silva et al. (em preparação).

3.8 Análise de frequência de cromossomos B na prole

A técnica de qPCR também foi aplicada para a verificação dos indivíduos da prole portadores de supranumerários com os mesmos genes utilizados para os indivíduos parentais. Após diagnóstico da presença/ausência de cromossomos supranumerários nas matrizes e nas respectivas proles, a taxa de transmissão de cromossomos B (kb) foi calculada a partir da média do número de cromossomos B da progênie, dividido pelo número total de B dos parentais de acordo com o método de (López-León et al. 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações obtidas através dos estudos genéticos efetuados no entendimento da herança do cromossomo B da espécie *Astyanax paranae* serão apresentadas na forma de artigo científico:

ARTIGO

Herança de cromossomos B em *Astyanax paranae* através de cruzamentos dirigidos.

Artigo

Herança de cromossomos B em *Astyanax paranae* através de cruzamentos dirigidos.

Resumo

Cromossomos B, ou supranumerários, são cromossomos adicionais ao conjunto padrão do organismo e considerados dispensáveis. Uma das características que definem os cromossomos B é a sua transmissão que foge dos padrões mendelianos, levando a acumulação ou extinção destes elementos. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi descrever, pela primeira vez, o padrão de transmissão do cromossomo B presente em *A. paranae* através de cruzamentos dirigidos. A análise dos cruzamentos revelou que o sexo do parental portador é determinante na transmissão do cromossomo B, sendo o índice de transmissão (kb) de 0,439 em cruzamentos onde somente o macho possui cromossomo B; 0,107 em cruzamentos onde apenas a fêmea é portadora de cromossomo B e 0,356 em cruzamentos onde ambos os parentais possuíam supranumerários. Apesar da ausência de acumulação atual, esta variante provavelmente possuiu um *drive* inicial, resultado na sua dispersão pela população analisada. A perda de sua capacidade de acumulação e consequente eliminação deve-se, provavelmente, ao aparecimento de genes supressores nos indivíduos da população, levando esta variante a um caminho aleatório em direção à extinção. Entretanto, devido à natureza polimórfica dos cromossomos B, esta variante pode sofrer mutações durante este processo, levando ao retorno da capacidade acumulativa e nova dispersão pela população.

Introdução

Astyanax é um gênero de peixes inserido na família Characidae, composto por aproximadamente 154 espécies válidas (Eschmeyer e Fong 2017). Estudos anteriores relatam um intenso polimorfismo cromossômico observado entre populações de espécies como *A. fasciatus*, *A. lacustris* e *A. scabripinnis*, o que leva alguns autores a considerarem estes grupos como complexos de espécies (Artoni et al. 2006; Castro et al. 2015; Moreira-Filho 1991), caracterizando-se como grupos onde é difícil identificar quando duas populações distintas compartilham o mesmo *pool* gênico ou formam diferentes espécies crípticas (Castro et al. 2015; Pansonato-Alves et al. 2014).

Astyanax paranae é parte do “complexo de espécies” *A. scabripinnis* (Moreira-Filho 1991) e os indivíduos coletados na bacia hidrográfica do rio Tietê, na região de Botucatu-SP podem apresentar um grande cromossomo B do tipo metacêntrico (Porto-Foresti et al. 1997; Silva et al. 2014, 2016). Estes cromossomos são elementos adicionais ao genoma e, geralmente, não seguem os padrões de herança mendeliana (Camacho et al. 2000, Houben 2017, Douglas e Birchler 2017), sendo compostos principalmente por sequências de DNA repetitivo, como os DNAs satélites e elementos móveis (Camacho 2005). Apesar de sabidamente portarem genes codificantes e funcionais (Klemme et al. 2013; Trifonov et al. 2013; Valente et al. 2014), estes elementos são classificados como dispensáveis aos portadores, uma vez que os indivíduos de uma determinada população não precisam deste cromossomo para completar o seu ciclo de vida.

Em estudo pioneiro, observou-se que a frequência de cromossomos B observada na população do Córrego Cascatinha (Botucatu, São Paulo) é de cerca

de 40% (Porto-Foresti et al. 1997), Além disso, diferenças nas frequências dos cromossomos B entre fêmeas (57,1%) e machos (8,7%) também foram observadas. Mais recentemente, uma caracterização estrutural mais significativa deste elemento supranumerário permitiu sua definição como um isocromossomo (Silva et al. 2014, 2016) através da detecção e análise de sequências de sítios de 18S rDNA e histona H1. Adicionalmente o uso de sondas B-específicas isoladas por microdissecção cromossômica correspondentes aos cromossomos B de *A. paranae*, *A. bockmanni* e *A. fasciatus* também foi realizado e sugere uma origem comum deste supranumerário (Silva et al. 2014, 2016). Finalmente, a aplicação de sequenciamento de nova geração no estudo dessa variante tem gerado dados genômicos relacionados ao conteúdo desta variante de supranumerário presente em *A. paranae* (Silva et al, em preparação), tornando-a um modelo para o estudo de cromossomos supranumerários em *Astyanax*.

Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de acúmulo, transmissão e comportamento meiótico dos cromossomos B em peixes, sendo estes bem documentados apenas na espécie *P. lineatus*, onde verifica-se uma variante de cromossomo B em estado de neutralização e outras duas em estado de eliminação (Penitente et al. 2013; Voltolin et al. 2010a; Voltolin et al. 2010b). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar a frequência, os padrões de transmissão e herança do macrocromossomo B presente em *A. paranae* através de cruzamentos dirigidos.

Material e Métodos

Foram coletados noventa indivíduos da população do córrego Cascatinha (22°53'22.5"S, 48°29'22.4"W), Botucatu, São Paulo, com autorização do MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO, e registro do IBAMA nº 2567470, utilizando-se de redes manuais e armadilhas de espera. Os animais foram transportados ao CEPTA-ICMBio, onde compõem os estoques de matrizes sob supervisão do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, Pirassununga, SP. A identificação do sexo dos animais coletados foi realizada através de observação de espículas na nadadeira anal (Garutti 1990) e os indivíduos portadores de cromossomos supranumerários foram identificados inicialmente através de citometria de fluxo usando como comparativo amostras de DNA haploide obtidas de sêmen de *A. lacustris*. Posteriormente, todas as amostras passaram por qPCR, onde foram quantificados os genes *sbno* e *nusap*, presente tanto nos cromossomos padrão quanto no cromossomo B, em comparação ao gene *hpri*, exclusivo dos cromossomos padrão da espécie. A quantificação comparativa desses elementos permitiu a confirmação se as amostras possuíam ou não cromossomo B.

Os cruzamentos foram direcionados visando analisar todas as possibilidades presentes na natureza e observar se existem diferenças entre as taxas de transmissão do cromossomo B quando este está presente apenas no parental masculino ou feminino, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Direcionamento dos cruzamentos envolvendo machos e fêmeas de *Astyanax paranae*, portadores e não portadores de cromossomos B.

Identificação do cruzamento	Matrizes
Cruzamento 01	Macho B- x Fêmea B-
Cruzamento 02	Macho B+ x Fêmea B-
Cruzamento 03	Macho B- x Fêmea B+
Cruzamento 04	Macho B+ x Fêmea B+

As reproduções seguiram as metodologias seminatural e induzida, de acordo com os protocolos estabelecidos em Baldisserotto 2005. Amostras das nadadeiras de todos os parentais, bem como larvas e embriões de cada cruzamento foram coletadas e fixadas em etanol 100% para a posterior confirmação da presença do cromossomo B através do qPCR. Posteriormente, o DNA de todos os materiais fixados foi extraído utilizando o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, conforme orientações do fabricante. A concentração de DNA das amostras foi padronizada em até 10 nanogramas de DNA por microlitro através do equipamento NanoDrop 2000c Spectrophotometer, seguindo as orientações do fabricante (Desjardins e Conklin 2010), para a posterior identificação dos indivíduos portadores de supranumerários através da qPCR. A taxa de transmissão de cromossomos B (kb) foi calculada a partir da média do número de cromossomos B da progênie, dividido pelo número total de B dos parentais de acordo com o método de López-León et al. 1992.

Resultados e Discussão

Para verificar a eficiência da citometria de fluxo em identificar indivíduos portadores de cromossomos B, vinte e sete matrizes foram submetidas a esta

técnica. As razões foram obtidas através da comparação da amostra de DNA diploide colhidas de um fragmento da nadadeira de uma das matrizes de *A. paranae* e uma amostra de DNA obtida de espermatozoides haploides de *A. lacustris*. Em etapa seguinte, as mesmas amostras foram submetidas à quantificação dos genes *sbno* (presente no supranumerário) e *hprt* (exclusivo dos cromossomos padrão A), para a validação das matrizes portadoras de supranumerários.

Após a validação das matrizes através da quantificação do gene *sbno* nas amostras, foi possível relacionar esses dados com os índices obtidos na citometria de fluxo (Tabela 01). Os limites estabelecidos para a ausência de cromossomo B foi ΔCT abaixo de 20 e, acima deste limite, os indivíduos foram considerados portadores de supranumerários.

A identificação de indivíduos portadores de cromossomos supranumerários foi possível, entretanto diagnosticou-se um grande limiar de inconsistência da técnica (0,471 até 0,485). Indivíduos que apresentaram valores próximos a 0,45 mostraram-se portadores de supranumerários, com aproximadamente 5% de diferença em peso do genoma em relação à amostra de DNA haploide. Indivíduos com índices acima de 0,485 mostraram-se não portadores de supranumerários, não apresentando diferenças significativas no peso do genoma total em relação a uma amostra haploide. Sendo assim, é possível observar que a citometria de fluxo é eficiente em identificar indivíduos posicionados em valores extremos.

Indivíduos que apresentaram valores entre 0,47 e 0,485 formam um grupo de inconsistência da técnica, não sendo possível verificar a presença ou ausência de cromossomos B na amostra, sendo necessária a utilização de outras técnicas para a análise desses indivíduos.

Tabela 2: Resultados obtidos em citometria de fluxo comparadas aos resultados obtidos em qPCR.

Indivíduo	Citometria	ΔCt	qPCR
10150	0,454	370,93	B+
10159	0,457	360,13	B+
10157	0,459	217,13	B+
10165	0,463	321,06	B+
10154	0,464	375,72	B+
10190	0,467	383,14	B+
10156	0,468	614,64	B+
10158	0,471	1,38	B-
10145	0,472	192,55	B+
10149	0,476	436,36	B+
10151	0,476	1,16	B-
10162	0,480	1,10	B-
10148	0,481	222,40	B+
10155	0,481	2,42	B-
10194	0,481	8,07	B-
10146	0,485	412,98	B+
10147	0,485	262,89	B+
10169	0,485	274,24	B+
10152	0,485	0,84	B-
10153	0,485	0,93	B-
10168	0,485	4,81	B-
10173	0,485	1,21	B-
10184	0,485	3,40	B-
10197	0,485	4,52	B-
10167	0,490	15,56	B-
10179	0,490	1,26	B-
10195	0,494	18,71	B-

Foram realizados 20 cruzamentos direcionados, sendo destes 11 reproduções seminaturais e 8 reproduções induzidas, através da extrusão de gametas. As reproduções seminaturais foram direcionadas da seguinte forma: duas réplicas de cruzamentos controle (macho B- x fêmea B-), três réplicas do cruzamento 2 (macho B+ x fêmea B-), três réplicas do cruzamento 3 (macho B- x fêmea B+) e três réplicas do cruzamento 4 (macho B+ x fêmea B+) (Figura 10).

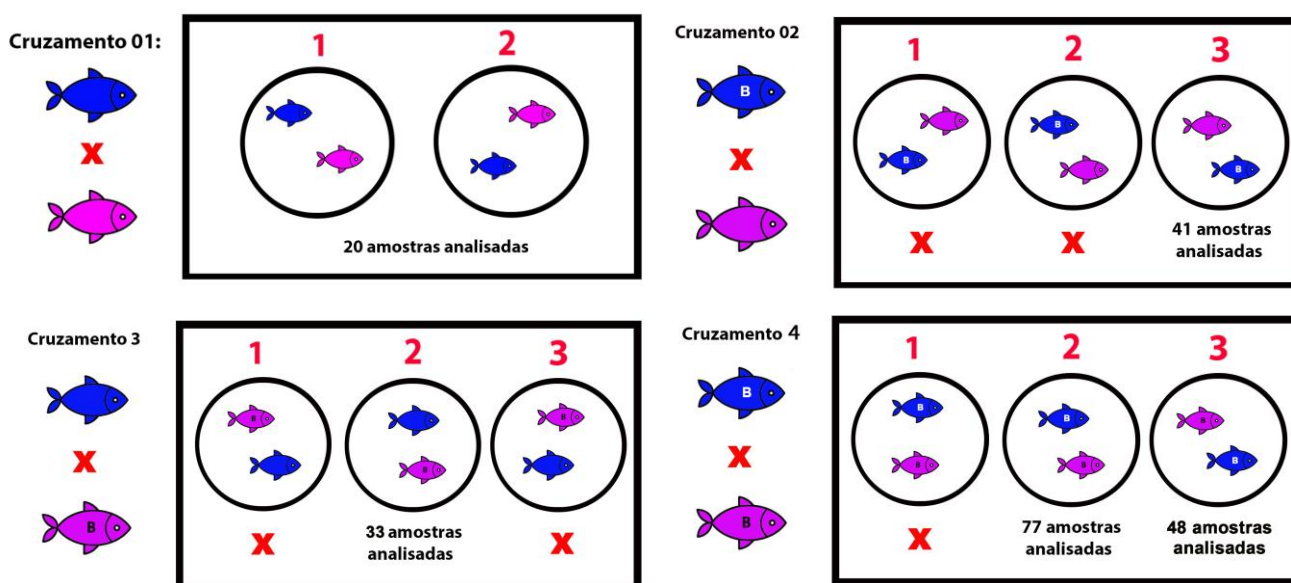


Figura 10: Cruzamentos por reprodução seminatural realizados em cada possibilidade prevista. A quantidade de amostras da F1 analisadas dentro de cada cruzamento foi: 20 amostras para o cruzamento 1 (controle); 41 amostras para o cruzamento 2; 33 amostras para o cruzamento 3 e 125 amostras para o cruzamento 4, em duas réplicas.

Tabela 3: Resumo dos cruzamentos bem sucedidos por reprodução seminatural e a quantidade de amostras da F1 analisadas.

Identificação do cruzamento	Matrizes	Quantidade de amostras da prole analisadas	Nº de réplicas
Cruzamento 01	Macho B- x Fêmea B-	20	1
Cruzamento 02	Macho B+ x Fêmea B-	41	1
Cruzamento 03	Macho B- x Fêmea B+	33	1
Cruzamento 04	Macho B+ x Fêmea B+	125	2

Em relação às reproduções induzidas, oito cruzamentos foram realizados. Entretanto a análise por qPCR revelou que os machos utilizados não eram portadores de supranumerários, resultando em 3 cruzamentos de interesse. Esses três cruzamentos serão tratados como réplicas do cruzamento 3 (Figura 11)

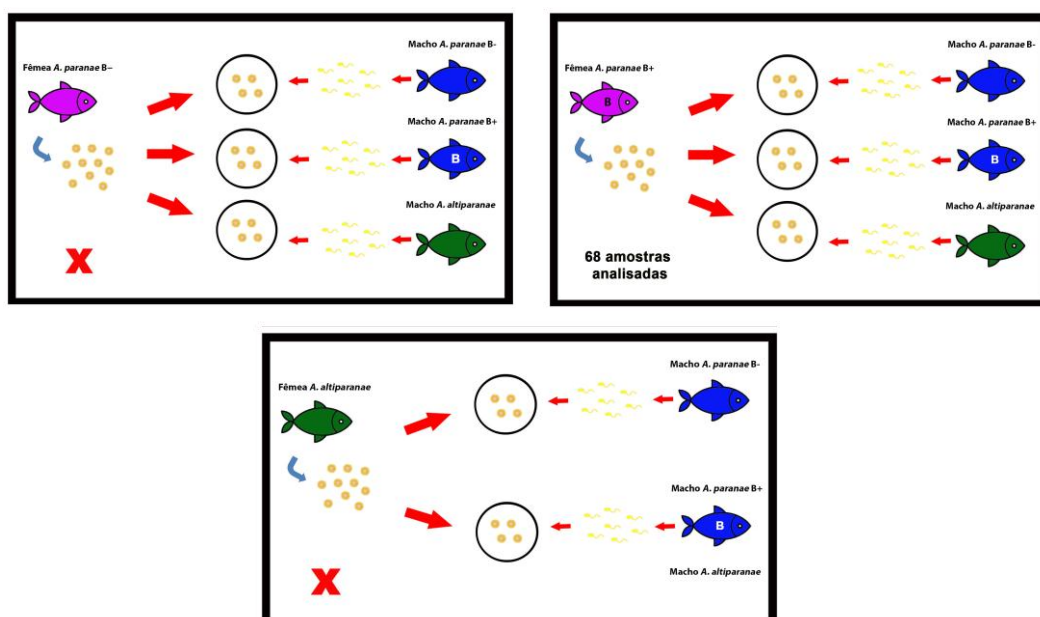


Figura 11: Direcionamento dos cruzamentos por reprodução induzida. Os oócitos das fêmeas foram fracionados e fertilizados com espermatozoides de diferentes machos. X representa cruzamentos mal sucedidos.

A quantificação do gene SBNO por qPCR permitiu a observação de quais indivíduos eram portadores de supranumerários dentre a prole. Os limites estabelecidos para a ausência de cromossomo B foi RQ abaixo de 10 (Silva et al. em preparação) e, acima deste limite, os indivíduos foram considerados portadores de supranumerários. As proporções de indivíduos portadores de supranumerários em cada cruzamento e seus índices de transmissão encontram-se na tabela 4. Os resultados da qPCR individuais encontram-se no material suplementar.

Tabela 4: Transmissão do cromossomo B.

Cruzamento	Réplica	0B	1B	2B	kb
Cruzamento 01	1	20	0	0	0
Cruzamento 02	1	23	18	0	0,439
Cruzamento 03	1	29	4	0	0,121
	2	20	3	0	0,130
	3	19	3	0	0,136
	4	23	1	0	0,041
Cruzamento 04	1	37	29	11	0,331
	2	18	22	7	0,382

Entre os cruzamentos analisados, o Cruzamento 01 (Fêmea 0B x Macho 0B) não apresentou nenhum indivíduo portador de supranumerário, caracterizando um cruzamento controle. O único cruzamento em que foi observado indivíduos com dois cromossomos supranumerários foi o Cruzamento 4 (Fêmea 1B x Macho 1B). Portanto, não se verificou nenhum caso de aumento no número de cromossomos B em um indivíduo em cruzamentos onde apenas um dos parentais era portador de supranumerário.

Os índices de transmissão dos cruzamentos onde apenas um dos parentais possui cromossomos B indicam que a herança do cromossomo supranumerário de *A. paranae* é dependente do sexo do parental portador, sendo o baixo índice de transmissão do cruzamento 3 (fêmea 1B x macho 0B) um indicativo a eliminação deste elemento, mesmo em proles híbridas de *A. paranae* e *A. lacustris*, enquanto o índice de transmissão do cruzamento 2 (fêmea 0B x macho 1B) indica uma herança em estado neutro. O cruzamento onde ambos os parentais possuíam supranumerários (cruzamento 4), demonstrou a herança não-mendeliana desta variante de cromossomo B, devido a fuga da proporção 1:2:1 esperada (indivíduos

0B, 1B e 2B, respectivamente). Ao considerar apenas os Bs sabidamente herdados do parental feminino nas proles do cruzamento 4, sendo estes representados pelos indivíduos 2B (um cromossomo herdado de cada parental), é possível verificar um kb muito próximo ao observado na análise das proles do cruzamento 3, sendo kb=0,142 para a primeira réplica do cruzamento 4 e kb=0,148 para a segunda réplica. Isso reforça o comportamento de eliminação do cromossomo supranumerário pelas fêmeas de *A. paranae*.

Tabela 5: Transmissão de cromossomos B pelas fêmeas no cruzamento 4

Cruzamento	0B	1B	2B	B vindo da Fêmea	Kb B vindo da Fêmea
Fêmea 1B x Macho 1B	37	29	11	11	0,142
Fêmea 1B x Macho 1B	18	22	7	7	0,148

A presença de cromossomos B é mais comum em fêmeas não somente em *A. paranae* (Porto-Foresti et al. 1997), mas também em *A. scabripinnis* (Vicente et al. 1996). A relação entre cromossomos B e sexo é discutida por vários autores, sendo proposta até mesmo a origem dos cromossomos supranumerários através dos cromossomos sexuais. Os resultados obtidos mostraram a capacidade diferencial de transmissão do cromossomo B entre os sexos, com a maior transmissão no cruzamento onde apenas os machos possuíam o supranumerário. A eliminação do cromossomo B pelas fêmeas provavelmente é devido a uma particularidade na formação de seus gametas, caracterizada pela eliminação do corpúsculo polar no momento da fertilização.

Sendo assim, é provável que haja um mecanismo que promova à migração do cromossomo supranumerário para a porção de DNA que será eliminada da célula (corpúsculo polar) na formação dos gametas femininos. A migração preferencial do

cromossomo supranumerário também é observada em plantas, como *Secale cereale* (Houben 2017), em que a migração preferencial resulta na acumulação do cromossomo B. No caso desta variante, o drive se dá pela migração do cromossomo B para o polo germinativo durante a formação dos gametas, devido à presença de uma região denominada *trans-acting non-disjunction control region* (NCR), que impede a disjunção normal das cromátides dos supranumerários durante a primeira mitose na formação dos gametas. Em peixes, o único relato de uma variante de cromossomo B em estado de eliminação é observado em *P. lineatus* (Penitente et al. 2013, 2015). Entretanto, neste estudo não é observado nenhuma relação entre o processo de eliminação do cromossomo B com o sexo do parental portador, tornando o presente estudo o primeiro a verificar esta relação em peixes.

Segundo Camacho et al. (2000) e Zurita et al. (1998), o ciclo de vida dos cromossomos B nas populações portadoras compreende em três fases: invasão, neutralização e extinção. Na fase neutra, os supranumerários devem sofrer mutações significativas em suas sequências de DNA para, novamente, reiniciar seu ciclo. Caso contrário, estarão destinados à extinção deste cromossomo na população em questão. Um exemplo de surgimento de novas variantes de supranumerários foi registrado em uma população de gafanhotos da espécie *E. plorans*. Os cromossomos B presentes nessa espécie são considerados mutáveis, sendo descritas mais de 50 variantes diferentes (Cabrero et al. 2014). Neste caso, foi registrada a substituição de uma variante de cromossomo B por outra (Zurita et al. 1998). Sendo assim, sugeriu-se um modelo de evolução dos cromossomos B em longo prazo, onde uma variante de cromossomo B parasítico teria perdido sua capacidade de acumulação e desaparecido da população após alcançar o estágio de neutralização.

Os dados obtidos dos índices de transmissão indicam um estágio neutro quando herdados de indivíduos machos (kb próximo a 0,5) e um estágio de eliminação quando herdados das fêmeas (kb próximo a 0,10), segundo o modelo de evolução a longo termo de um cromossomo B parasítico (Camacho et al. 2000). Os dois modelos principais que explicam a manutenção dos cromossomos B em populações naturais são o modelo heterótico (White 1977), em que os cromossomos B seriam mantidos devido às vantagens adaptativas que conferem aos seus portadores, tendo um impacto positivo no *fitness* do indivíduo, desde que em números baixos, e o modelo parasítico (Nur 1969, 1985, 1987; Shaw e Hewitt, 1990), que consideram que a permanência dos cromossomos B nas populações deve-se a seus próprios meios de acúmulo, caracterizando estes elementos como parasitas, já que estes não trariam nenhuma vantagem aos seus portadores.

Segundo Camacho et al. (2000), as possibilidades de manutenção de um cromossomo supranumerário em uma população resumem-se à combinação entre a capacidade que este elemento tem de se acumular (*drive*) e seus efeitos ao portador. Se o supranumerário causa algum efeito positivo ao *fitness* do organismo, este se torna um elemento mutualista e é mantido na população, independente de sua capacidade de acumulação. Já as variantes que não interferem no *fitness* do indivíduo e possuem a capacidade de acumulação são consideradas parasitas e se mantêm na população através de seus próprios métodos. Um cromossomo B próximo à neutralidade tem a tendência a ser eliminado da população, através de uma caminhada evolutiva aleatória. Deve-se notar que, mesmo sem a capacidade acumulativa e sofrendo eliminação pelas fêmeas, os cromossomos supranumerários na população analisada mantem-se em proporções próxima as descritas em Porto-Foresti et al. 1997, correspondendo a cerca de 57% da população. Esse fenômeno

levanta questionamentos a cerca da incapacidade do cromossomo supranumerário em impactar positivamente a adaptação do organismo.

Sendo assim, a não ser que os cromossomos B tenham um drive inicial, não é possível que se estabeleçam na população (Camacho et al. 1997). Em uma simulação estatística, um cromossomo B em estado de neutralidade e sem impacto no fitness do indivíduo seria eliminado em 18 gerações (Camacho et al. 1997). A hipótese de que as variantes de cromossomos B mantidas nas populações possuem uma capacidade acumulativa inicial também é suportada por López-León et al. 1992 para o cromossomo B neutro de *E. plorans*, e afirmada pelos cruzamentos experimentais promovidos por Herrera et al. 1996, que identificou um índice de transmissão (kb) de 0,48 resultante dos cruzamentos entre gafanhotos fêmeas portadoras de supranumerários com machos 0B da mesma população. Entretanto, quando estas mesmas fêmeas foram submetidas a cruzamentos com machos 0B de outra população, o kb mostrou uma acumulação significativa (kb=0,63). Sendo assim, o cromossomo B de *A. paranae*, que não apresenta capacidade acumulativa atualmente, deve ter passado por um drive inicial, resultando em um processo de acumulação nas primeiras gerações após seu aparecimento e levando a um número de indivíduos portadores elevado, como observado na população do Córrego Cascatinha. Entretanto, ao longo do tempo, esta variante deve ter perdido sua capacidade acumulativa, resultando no estado atual.

Um dos fatores que podem levar à perda da capacidade de acumulação dos cromossomos B é a seleção positiva de alelos presentes no genoma do organismo que possam suprimir o drive dos supranumerários, devido ao fato dos cromossomos B imporem uma carga genética à população (Camacho et al. 1997). Genes supressores de drive são descritos em *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw e Hewitt

1985), *Pseudococcus affinis* (Nur e Brett 1985, 1987, 1988) e *E. plorans* (Herrera et al. 1996). Sendo assim, mesmo uma variante em estado de neutralidade pode apresentar a capacidade de acumulação quando introduzida em outras populações que não apresentem supranumerários, devido à ausência de genes supressores de drive nesses organismos.

Indivíduos portadores de dois cromossomos B são muito raros na natureza (Porto-Foresti et al. 1997; Silva et al. 2014, 2016). Nos cruzamentos analisados, apenas a combinação de dois parentais com um cromossomo B produziu indivíduos com dois supranumerários, apesar de estes indivíduos estarem abaixo dos índices esperados numa transmissão mendeliana. O máximo de cromossomos B que uma espécie pode tolerar pode ser medido através da observação do número máximo de cromossomos supranumerários observado em um indivíduo adulto (Camacho et al. 2000). Cruzamentos induzidos em *P. lineatus* produziram indivíduos com até nove cromossomos B, sem prejuízo aparente no *fitness* dos indivíduos (Voltolin et al. 2011), sendo este número de cromossomos B nunca observado em indivíduos selvagens ou de cultivo. Diversos autores definem que, quando em números baixos, os cromossomos supranumerários não causam efeito algum ao indivíduo portador (Nur 1969, 1985, 1987; Shaw e Hewitt, 1990). Os resultados observados permitiram a verificação do desenvolvimento normal de indivíduos de *A. paranae* possuindo dois cromossomos supranumerários em condições controladas, até o estágio larval. O fato de este tipo de indivíduo ser pouco frequente nas proles analisadas deve-se ao fato da baixa transmissão dos supranumerários pelas fêmeas, impactando o número final de indivíduos com dois cromossomos supranumerários no cruzamento 4. Em ambiente natural, deve-se ressaltar que este tipo de cruzamento é mais raro, devido à frequência reduzida de machos portadores de cromossomo B.

Conclusão

Conclui-se que a herdabilidade da variante de cromossomos supranumerários presente na população de *A. paranae* estudada é diretamente dependente do sexo do parental portador. Observou-se um padrão de transmissão neutro para machos portadores, em oposição à eliminação demonstrada na avaliação da transmissão dos cromossomos B pelas fêmeas. A hipótese de esta variante ter tido um drive inicial em seu surgimento é plausível, resultando na dispersão observada na população e neutralizada ao longo do tempo possivelmente em decorrência ao aparecimento de genes supressores de drive na população.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da quantificação gênica por qPCR foi eficiente em identificar indivíduos de *A. paranae* portadores de supranumerários. A citometria de fluxo é uma alternativa mais barata e rápida para realizar esta identificação, entretanto, um limiar de inconfiabilidade da identificação foi observado. O desenvolvimento de mecanismos de identificação cada vez mais precisos e baratos de animais que possuem cromossomo B sem exigir o sacrifício do organismo é muito relevante e podem subsidiar estudos futuros que solucionem questões relacionadas ao comportamento evolutivo, a transmissão para a prole e os possíveis efeitos da presença de um cromossomo supranumerário para o organismo.

A variante de cromossomo B observada neste trabalho não apresentou comportamento acumulativo, segundo o ciclo de vida do cromossomo parasita postulado por Camacho et al 2000. Sendo assim, a variante analisada, se não possuir em efeito benéfico aos seus portadores, deve seguir um caminho evolutivo aleatório ao longo das gerações, o que potencialmente pode levar a sua eliminação na população estudada. Apesar de seu estado atual, um drive inicial deve ter ocorrido, promovendo a dispersão do cromossomo B na população do Córrego Cascatinha. Entretanto, ao longo das gerações, alelos com a capacidade de suprimir o drive podem ter aparecido, causando a perda da capacidade de acumulação destes elementos. Sendo assim, apesar de neutro, é possível que os supranumerários presentes nesta população apresentem acumulação se introduzidos em outras populações que não possuam supranumerários ou em outras espécies, através da hibridização.

Uma diferença significativa entre as taxas de transmissão do cromossomo supranumerário foi observada entre o sexo dos parentais, indicando um mecanismo de eliminação em fêmeas portadoras de cromossomos B para a espécie *Astyanax paranae*. Apesar dos relatos de maior quantidade de fêmeas portadoras de cromossomos B nas populações naturais, não foi possível relacionar a presença do cromossomo B com a proporção sexual neste trabalho. Apesar de raros em ambientes selvagens, diagnosticamos indivíduos portadores de dois cromossomos B nos cruzamentos em que ambos os parentais possuíam supranumerários, sem aparente perda do *fitness*. Sendo assim, a raridade destes organismos pode ser devida a baixa frequência deste cruzamento na natureza, que apresenta grande número de fêmeas portadoras de supranumerários, enquanto machos que possuem cromossomos B são mais raros.

O presente trabalho descreve pela primeira vez a taxa de transmissão de cromossomo B em *Astyanax*, e verifica a transmissão diferencial entre machos e fêmeas. As conclusões obtidas contribuirão de forma significativa para o estudo deste elemento neste grupo, completando uma lacuna existente e dando subsidio para novos pontos de vista a cerca de dados já obtidos neste âmbito. Além disso, os dados acerca da dinâmica evolutiva do cromossomo B produzidos levantam questionamentos relacionados aos métodos de eliminação observado nas fêmeas, da dinâmica populacional de manutenção do cromossomo B e suas relações com a diferenciação sexual, abrindo margem e dando meios para a resolução destas questões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelini E, Martins-Santos IC, Fernandes CA (2014). Cytogenetic Analysis in Three Species from Genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes) with a New Occurrence of B Chromosome in *Astyanax paranae*. *Caryologia*, 67(2): 160–171.
- Ahmad SF, Martins C (2019). The Modern View of B Chromosomes Under the Impact of High Scale Omics Analyses. *Cells* 8(2): 156.
- Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MCD, Vicari MR, Bertollo LAC (2006). *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): Evidences of a Species Complex in the Upper Rio Tibagi Basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology* 4(2): 197–202.
- Auger DL, Birchler JA (2002). Maize Tertiary Trisomic Stocks Derived from BA Translocations. *Journal of Heredity* 93(1): 42–47.
- Bakkali M, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM (1999). The B Chromosome Polymorphism of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. I. B Variants and Frequency. *Heredity* 83(4): 428.
- Baldisserotto B (2005). Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil. Editora UFSM.
- Battaglia E (1964). Cytogenetics of B-Chromosomes. *Caryologia* 17(1): 245–299.
- Belyayev A, Raskina O (2013). Chromosome Evolution in Marginal Populations of *Aegilops speltoides*: Causes and Consequences. *Annals of botany* 111(4): 531–38.
- Beukeboom LW (1994). Bewildering Bs: An Impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity* 73(3): 328–335.
- Bougourd SM, Parker JS (1979). The B-Chromosome System of *Allium schoenoprasum*. *Chromosoma* 53(3): 273–282.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007). Catálogo Das Espécies de Peixes de

Água Doce Do Brasil. Museu Nacional Rio de Janeiro.

- Cabrero J, López-León MD, Ruiz-Estévez M, Gómez R, Petitpierre E, Rufas JS, Massa B, Kamel Ben Halima M, Camacho JPM (2014). B1 Was the Ancestor B Chromosome Variant in the Western Mediterranean Area in the Grasshopper *Eyrepocnemis Plorans*. *Cytogenetic and genome research* 142(1): 54–58.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM (1999). Common Origin of B Chromosome Variants in the Grasshopper *Eyrepocnemis Plorans*. *Heredity* 83(4): 435-439.
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD, Shaw MW (1997). Evolution of a near-Neutral B Chromosome. *Chromosomes Today*, Springer, 301–318.
- Camacho JPM (2005). B Chromosomes. *The Evolution of the Genome*, Elsevier, 223–286.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000). B-Chromosome Evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 355(1394): 163–178.
- Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta OA, Santos MH, Nogaroto V, Vicari MR, Almeida MC, Artoni RF (2015). Diversity of the *Astyanax scabripinnis* Species Complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: Species Limits and Evolutionary Inferences. *Reviews in fish biology and fisheries* 25(1): 231–244.
- Cavalcanti MPC, Gomes YM (2008). Avanços Biotecnológicos Para O Diagnóstico Das Doenças Infecciosas e Parasitárias. *Revista de Patologia Tropical* 37(1): 1–14.
- Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM (2000). Frequency Increase and Mitotic Stabilization of a B Chromosome in the Fish *Prochilodus lineatus*.

- Chromosome Research 8(7): 627–634.
- Chiavarino AM, Rosato M, Rosi P, Poggio L, Naranjo CA (1998). Localization of the Genes Controlling B Chromosome Transmission Rate in Maize (*Zea Mays* Ssp. *Mays*, Poaceae).” American journal of botany 85(11): 1581–1585.
- D’Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, Kovarik A, Xaxars GM, Garcia S (2017). B-chrom: A Database on B-chromosomes of Plants, Animals and Fungi. New Phytologist 216(3): 635–642.
- Daniel-Silva MDF, Almeida-Toledo LF (2001). Chromosome R-Banding Pattern and Conservation of a Marker Chromosome in Four Species, Genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). Caryologia 54(3): 209–215.
- Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti F (2012). Cytogenetic Characterization of Distinct B Chromosomes in a Population of the Fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). Caryologia 65(3): 229–233.
- Daniel SN, Penitente M, Hashimoto DT, Silva DMZA, Foresti F, Porto-Foresti F (2015). New Insights into Karyotypic Relationships among Populations of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes) of Different Watersheds.” Zebrafish 12(2): 181–188.
- Desjardins P, Conklin D (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of visualized experiments: JoVE (45):2565.
- Douglas RN, Birchler JA (2017). B Chromosomes. Chromosome Structure and Aberrations, Springer, 13–39.
- Endo TR, Nasuda S, Jones N, Dou Q, Akahori A, Wakimoto M, Tanaka H, Niwa K, Tsujimoto H (2008). Dissection of Rye B Chromosomes, and Nondisjunction Properties of the Dissected Segments in a Common Wheat Background. Genes

- & genetic systems 83(1): 23–30.
- 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). Species by Family/Subfamily. Eletronic version in <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
- Fazoli LC, Silva VDAB, Portela-Casto ALB, Junior HFJ (2003). Chromosome characterization os *Astyanax* sp B (Characidae, Tetragonopterinae), na endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil. *Cytologia* 68(4): 389-394.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1990). Supernumerary Chromosomes in a *Rhamdia hilarii* Population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81(3): 193–198.
- Fenocchio AS, Bertolo LAC, Takahashi CS, Camacho JPM (2000). B Chromosomes in Two Fish Species Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae).” *Folia Biologica-(Krakow)* 48(3/4): 105–110.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1989). Supernumerary Chromosome System, C-Banding Pattern Characterization and Multiple Nucleolus Organizer Regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae).” *Genetica* 79(2): 107–114.
- Fricke R, Eschmeyer WN, van der Laan R (2019). Catalog of Fishes: Genera, Species, References. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> [Electronic version accessed 22/04/2019].
- Garutti V (1990). Caráter Sexual Secundário Em *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), Relacionado Às Nadadeiras Anal E Pélvicas.”

- Naturalia 15: 109–119.
- Håkansson A (1959). Behaviour of Different Small Accessory Rye Chromosomes at Pollen Mitosis. *Hereditas* 45(4): 623–631.
- Hasegawa N (1934). A Cytological Study on 8-Chromosome Rye. *Cytologia* 6(1): 68–77.
- Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2008). First Report of a B Chromosome in a Natural Population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 275–278.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM (1996). Evidence for B Chromosome Drive Suppression in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76(6): 633-639.
- Holmes DS, Bougourd SM (1989). B-Chromosome Selection in *Allium schoenoprasum*. I. Natural Populations. *Heredity* 63(1): 83-87.
- Houben A, Thompson N, Ahne R, Leach CR, Verlin D, Timmis JN (1999). A Monophyletic Origin of the B Chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 219(1–2): 127–135.
- Houben A (2017). B Chromosomes—a Matter of Chromosome Drive. *Frontiers in plant science* 8: 210.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S (2013). Biology and Evolution of B Chromosomes. *Plant Genome Diversity Volume 2*, Springer, 149–165.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Rejon CR, Parker JS (1995). Characterisation of Repeated Sequences from Microdissected B Chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104(2): 113–120.
- Jamilena M, Rejón CR, Rejon MR (1994). A Molecular Analysis of the Origin of the *Crepis capillaris* B Chromosome. *Journal of Cell Science* 107(3): 703–708.

- Jesus CM, Galetti PM, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003). Molecular Characterization and Chromosomal Localization of Two Families of Satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a Species with B Chromosomes. *Genetica* 118(1): 25–32.
- Jones RN (1991). B-Chromosome Drive. *The American Naturalist* 137(3): 430–442.
- Jones RN, Rees H (1982). B Chromosomes. Academic Press.
- Juvonen SK, Salo J (2004). Sustainable Use of Ornamental Fish Populations in Peruvian Amazonia. *Lyonia* 7(2): 53–59.
- Kavalco KF, Almeida-Toledo LF (2007). Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4(2): 103–111.
- Kavalco KF, Brandão KO, Pazza R, Almeida-Toledo LF (2009). *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A New Species Complex within the Genus *Astyanax*? *Genetics and Molecular Biology* 32(3): 477–483.
- Keyl HG, Hägele K (1971). B-Chromosomen bei Chironomus. *Chromosoma* 35(4): 403–417.
- Kimura M, Kayano H (1961). The Maintenance of Supernumerary Chromosomes in Wild Populations of *Lilium callosum* by Preferential Segregation. *Genetics* 46(12): 1699.
- Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A (2013). High-copy Sequences Reveal Distinct Evolution of the Rye B Chromosome. *New Phytologist* 199(2): 550–558.
- Lima FCT (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. Check list of the freshwater fishes of South and Central America: 106–169.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM, Cano MI, Santos JL (1992). A

- Widespread B Chromosome Polymorphism Maintained without Apparent Drive. *Evolution* 46(2): 529–539.
- Mackay IM (2004). Real-Time PCR in the Microbiology Laboratory. *Clinical microbiology and infection* 10(3): 190–212.
- Maistro EL, Dias LA, Foresti F, Oliveira C, Moreira-Filho O (1994). Natural Triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and Simultaneous Occurrence of Macro B-Chromosomes. *Caryologia* 47(3–4): 233–239.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1992). Occurrence of Macro B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87(2): 101–106.
- Martins-Queiroz MF, Mateus LAF, 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.
- McAllister BF, Werren JH (1997). Hybrid Origin of a B Chromosome (PSR) in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106(4): 243–253.
- Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL, Moura RL (2003). Catálogo Das Espécies de Peixes Marinhos Do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo São Paulo.
- Mestriner CA, Galetti PM, Valentini SR, Ruiz IR, Abel LD, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000). Structural and Functional Evidence That a B Chromosome in the Characid Fish *Astyanax scabripinnis* Is an Isochromosome. *Heredity* 85(1): 1–9.
- Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC (1997). Macro-and Microchromosomes B in Females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127(3): 249–253.
- Moreira-Filho, Orlando. 1991. “*Astyanax Scabripinnis* (Pisces; Characidae): A’

- species Complex.” *Brazil. J. Genet.* 14: 331–57.
- 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(1): 59–64.
- Moreira-Filho O, Galleti Jr. PM, Bertollo LAC (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. *Cytogenetic and Genome Research* 106:230-234.
- Moreira CLR (2007). Relações Filogenéticas Na Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- Müntzing A (1945). Cytological Studies of Extra Fragment Chromosomes in Rye II. Transmission and Multiplication of Standard Fragments and Iso-fragments. *Hereditas* 31(3-4): 457–477.
- Müntzing A (1948). Cytological Studies of Extra Fragment Chromosomes in Rye: A New Fragment Type Arisen By Deletion. *Hereditas* 34(4): 435–442.
- Nur U (1969). Mitotic Instability Leading to an Accumulation of B-Chromosomes in Grasshoppers. *Chromosoma* 27(1): 1–19.
- Nur U, Brett BLH (1985). Genotypes Suppressing Meiotic Drive Of A B Chromosome In The Mealybug *Pseudococcus obscurus*. *Genetics* 110(1): 73–92.
- Nur U, Brett BLH (1987). Control of Meiotic Drive of B Chromosomes in the Mealybug, *Pseudococcus affinis* (Obscurus). *Genetics* 115(3): 499–510.
- Nur U, Brett BLH (1988). Genotypes Affecting the Condensation and Transmission of Heterochromatic B Chromosomes in the Mealybug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma* 96(3): 205–212.
- Ohta S (1996). Mechanisms of B-Chromosome Accumulation in *Aegilops mutica* Boiss. *Genes & Genetic Systems* 71(1): 23–29.

- Oliveira C (1993). Occurrence of Supernumerary Microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiforms, 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(5): 473-476.
- Paiva SR, Dergam JA, Machado F (2006). Determining Management Units in Southeastern Brazil: The Case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)(Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 560(1): 393–404.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Costa-Silva GJ, Vicari MR, 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, Lozano R, Taylor S, Rejon MR (1991). Chromosomal Structure of Populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67(3): 287-297.
- Pauls E, Bertollo LAC (1983). Evidence for a System of Supernumerary Chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36(4): 307–314.
- Pauls E, Bertollo LAC (1990). Distribution of a Supernumerary Chromosome System and Aspects of Karyotypic Evolution in the Genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 81(2): 117–123.
- 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). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 85(4):1371-1377.

- Penitente M, Daniel SN, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2015). Transmission Behavior of B Chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenetic and genome research* 147(2–3): 179–185.
- Peppers JA, Wiggins LE, Baker RJ (1997). Nature of B Chromosomes in the Harvest Mouse *Reithrodontomys megalotis* by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). *Chromosome Research* 5(7): 475–479.
- Perfectti F, Werren JH (2001). The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. *Evolution* 55(5): 1069–1073.
- Plowman AB, Bougourd SM (1994). Selectively Advantageous Effects of B Chromosomes on Germination Behaviour in *Allium schoenoprasum* L.” *Heredity* 72(6): 587-593.
- Pohler W, Schlegel R (1990). A Rye Plant with Frequent A-B Chromosome Pairing. *Hereditas* 112(3): 217–220.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F (1997). Estimated Frequency of B-Chromosomes and Population Density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a Small Stream. *Brazilian Journal of Genetics* 20(3).
- Potapov VA, Solov'ev VV, Romashchenko AG, Sosnovtsev SV, Ivanov SV (1990). Features of the Structure and Evolution of Complex, Tandemly Organized Bsp-Repeats in the Fox Genome. I. Structure and Internal Organization of the BamHI-Dimer. *Molekuliarnaia biologii* 24(6): 1649–1665.
- Reis RE, Albert JS, Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA (2016). Fish Biodiversity and Conservation in South America. *Journal of fish biology* 89(1): 12–47.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003). Check List of the Freshwater Fishes of

South and Central America. Edipucrs.

- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV, Bochkaerev MN, Kartavtseva IV, Roslik GV, Borissov YM (2004). Comparative Analysis of Micro and Macro B Chromosomes in the Korean Field Mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) Performed by Chromosome Microdissection and FISH.” Cytogenetic and genome research 106(2–4): 289–294.
- Santos LP, Castro JP, Francisco CM, Vicari MR, Almeida MC, Goll GL, 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): 48.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M, Parzefall J (1995). Incorporation of Subgenomic Amounts of DNA as Compensation for Mutational Load in a Gynogenetic Fish. Nature 373(6509): 68-71.
- Shaw MW, Hewitt GM (1985). The Genetic Control of Meiotic Drive Acting on the B-Chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae).” Heredity 54(2): 187-194.
- Shaw MW, Hewitt GM (1990). B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next? Oxford surveys in evolutionary biology 7:197-223.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F (2014). Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). PLoS One 9(4): e94896.
- Silva DMZA, Daniel SN, Camacho JPM, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Penitente M,

- Pansonato-Alves JC, Hashimoto DT, Oliveira C, Porot-Foresti F, Foresti F (2016). Origin of B Chromosomes in the Genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the Limits of Chromosome Painting.” *Molecular Genetics and Genomics* 291(3): 1407–1418.
- Stitou SR, La Guardia RD, Jiménez R, Burgos M (2000). Inactive Ribosomal Cistrons Are Spread throughout the B Chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for Their Origin and Evolution.” *Chromosome Research* 8(4): 305–311.
- Szczerbal I, Switonski M (2003). B Chromosomes of the Chinese Raccoon Dog (*Nyctereutes Procyonoides Procyonoides* Gray) Contain Inactive NOR-like Sequences. *Caryologia* 56(2): 213–216.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010). B Chromosome Ancestry Revealed by Histone Genes in the Migratory Locust. *Chromosoma* 119(2): 217–225.
- Torres-Mariano AR, Moreli S (2008). B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetic and Molecular Biology* 31(1): 246-249.
- 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.
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, O’Brien PCM, Perelman PL, Yang F, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS (2013). Transcription of a Protein-Coding Gene on B Chromosomes of the Siberian Roe Deer (*Capreolus pygargus*). *BMC biology* 11(1): 90.

- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Hashimoto DT, Oliveira C, Trifonov VA, Porto-Foresti F, Camacho JPM, Foresti F (2016). Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). PloS one 11(3): e0150573.
- 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. Molecular biology and evolution 31(8): 2061–2072.
- Vari RP, Malabarba LR (1998). Neotropical Ichthyology: An Overview. Phylogeny and classification of Neotropical fishes 1: 1–12.
- Venere PC, Miyazawa CS, Galetti PM (1999). New Cases of Supernumerary Chromosomes in Characiform Fishes. Genetics and Molecular Biology 22(3): 345–349.
- 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 and Genome Research 74(1–2): 70–75.
- Volobujev VT (1984). The B-Chromosome System of Mammals. Genetica 52(1): 333–337.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010). Supernumerary Chromosome Inheritance in the Curimatá (*Prochilodus lineatus*) of the Mogi-Guaçu River. Hereditas 147(3): 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, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010). B-Chromosome Frequency Stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 138(3): 281–284.
- White MJD (1977). *Animal Cytology and Evolution*. CUP Archive.
- Wilson EB (1907). The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science* 26: 870-871.
- Wurster-Hill DH, Ward OG, Davis BH, Park JP, Moyzis RK, Meyne J (1988). Fragile Sites, Telomeric DNA Sequences, B Chromosomes, and DNA Content in Raccoon Dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with Comparative Notes on Foxes, Coyote, Wolf, and Raccoon. *Cytogenetic and Genome Research* 49(4): 278–281.
- Xavier PLP, Senhorini JA, Pereira-Santos M, Fujimoto T, Shimoda E, Silva LA, dos Santos SA, Yasui GS (2017). A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. *Frontiers in Genetics* 8:131.
- Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J, Neitzel H, Lin CC, Ferguson-Smith MA (1997). Chromosomal Evolution of the Chinese Muntjac (*Muntiacus reevesi*). *Chromosoma* 106(1): 37–43.
- Yasui GS, Senhorini JA, Shimoda E, Pereira-Santos M, Nakaghi LSO, Fujimoto T, Arias-Rodriguez L, Silva LA (2015). Improvement of Gamete Quality and Its Short-Term Storage: An Approach for Biotechnology in Laboratory Fish. *animal* 9(3): 464–470.
- Zanata AM, Camelier P (2009). *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgerai*: New Characid Fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil.

Neotropical Ichthyology 7(2): 175–184.

Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (1998). Polymorphism
Regeneration for a Neutralized Selfish B Chromosome. *Evolution* 52(1): 274–
277.

7 MATERIAIS COMPLEMENTARES

Tabela 6: Amostras analisadas do cruzamento 01 por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
10137 (matriz fêmea)	1,37620488	0B
10138 (matriz macho)	1,73645435	0B
10923	0,91914147	0B
10924	1,04217737	0B
10925	0,85876905	0B
10926	0,71399535	0B
10927	0,95206154	0B
10928	0,74609572	0B
10929	0,93570842	0B
10930	0,56884129	0B
10931	0,73283553	0B
10932	0,66101013	0B
10933	0,96057417	0B
10934	0,69884556	0B
10935	1,08719248	0B
10936	0,48912111	0B
10937	1,16736763	0B
10938	14,3082909	0B
10939	2,93787565	0B
10940	1,91103324	0B
10941	1,14267206	0B
10942	4,69239282	0B
10943	4,15964767	0B

Tabela 7: Amostras analisadas do cruzamento 02 por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
10141 (matriz fêmea)	1,4728	0B
10142 (matriz macho)	451,7580	1B
10211	10,37217	0B
10212	19,51924	0B
10213	82,11334	1B
10214	398,4682	1B
10215	711,5631	1B
10216	402,181	1B
10232	1,087468	0B
10233	1,528439	0B
10234	105,7608	1B
10235	8,348592	0B
10236	143,8439	1B
10237	0,962019	0B
10238	216,7376	1B
10239	122,1208	1B
10241	208,2586	1B
10242	2,771082	0B
10243	2,364166	0B
10244	210,6088	1B
10245	279,7123	1B
10246	3,784706	0B
10247	2,622813	0B
10248	216,133	1B
10249	115,9043	1B
10250	242,2455	1B
10251	83,80108	1B
10252	77,52514	1B
10253	8,046151	0B
10254	238,4945	1B
10255	7,864189	0B
10256	1,404647	0B
10257	3,748846	0B
10258	9,556998	0B
10259	9,068658	0B
10260	1,263296	0B
10261	3,225297	0B
10262	52,98207	1B
10263	1,323101	0B
10265	0,135002	0B
10266	14,73158	0B
10267	0,271385	0B

Tabela 8: Amostras analisadas do cruzamento 03 (réplica 1) por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
10202 (matriz fêmea)	78,588	1B
10201 (matriz macho)	4,118	0B
11545	1,2152	0B
11546	8,9806	0B
11547	1,6483	0B
11548	0,538	0B
11549	7,0195	0B
11552	57,1359	1B
11553	0,727	0B
11554	4,5745	0B
11555	46,2941	1B
11556	46,8202	1B
11558	1,5496	0B
11559	0,7651	0B
11560	0,1267	0B
11561	9,0675	0B
11562	0,6835	0B
11563	0,4081	0B
11564	1,1525	0B
11565	0,1342	0B
11566	3,7808	0B
11567	6,3346	0B
11592	0,2907	0B
11593	2,3498	0B
11594	5,9042	0B
11595	1,2877	0B
11596	50,9127	1B
11597	3,5773	0B
11598	3,1563	0B
11599	1,1332	0B
11600	0,2687	0B
11601	9,1733	0B
11603	0,0803	0B
11605	0,1488	0B
11606	2,0836	0B

Tabela 9: Amostras analisadas do cruzamento 03 (réplica 2) por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
12546 (matriz fêmea)	54,430	1B
A. lacustris (matriz macho)	-	0B
12565	0,6491	0B
12566	1,7302	0B
12567	0,6949	0B
12568	0,7015	0B

12569	23,551	1B
12570	0,558	0B
12571	0,5913	0B
12572	0,7846	0B
12573	2,235	0B
12574	13,9197	1B
12575	0,662	0B
12576	25,7638	1B
12593	0,9855	0B
12594	0,3103	0B
12595	0,656	0B
12596	0,8267	0B
12597	0,8407	0B
12598	1,1399	0B
12599	0,3474	0B
12600	1,0046	0B
12601	0,5512	0B
12602	0,8557	0B
12603	0,9371	0B

Tabela 10: Amostras analisadas do cruzamento 03 (réplica 3) por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
12546 (matriz fêmea)	54,430	1B
12730 (matriz macho)	0,067	0B
12605	1,7774	0B
12606	1,1853	0B
12607	0,9264	0B
12608	2,2154	0B
12609	1,7619	0B
12611	1,2866	0B
12612	1,0579	0B
12613	2,0342	0B
12614	0,9203	0B
12615	1,1462	0B
12617	1,4741	0B
12618	1,8938	0B
12619	0,9927	0B
12620	1,1606	0B
12621	1,3851	0B
12622	1,1748	0B
12623	9,2440	1B
12624	1,5637	0B
12625	4,0012	0B
12626	8,4501	1B
12627	9,7545	1B
12628	0,8580	0B

Tabela 11: Amostras analisadas do cruzamento 03 (réplica 4) por qPCR.

Indivíduo	RQ	Resultado
12546 (matriz fêmea)	54,430	1B
12541 (matriz macho)	3,529	0B
12629	0,7498	0B
12630	0,8644	0B
12631	0,5874	0B
12632	1,1116	0B
12633	0,3373	0B
12634	0,5052	0B
12635	0,456	0B
12636	0,7245	0B
12637	19,8501	1B
12638	0,3159	0B
12639	0,3918	0B
12640	0,4044	0B
12641	0,3405	0B
12642	0,3934	0B
12643	0,5976	0B
12644	0,6806	0B
12645	3,3241	0B
12646	0,445	0B
12647	1,188	0B
12648	1,0972	0B
12649	0,4535	0B
12650	1,2605	0B
12651	0,9577	0B
12652	0,6814	0B

Tabela 12: Amostras analisadas do cruzamento 04 (réplica 1) por qPCR

Indivíduo	RQ	Resultado
10203 (Matriz macho)	71,841	1B
10204 (Matriz fêmea)	53,834	1B
11568	0,231467	0B
11569	82,94946	1B
11570	211,6396	2B
11571	49,19707	1B
11572	1,498021	0B
11574	169,1112	2B
11575	0,569275	0B
11576	108,8114	2B
11577	65,38032	1B
11578	135,9954	2B
11580	0,004835	0B
11581	190,1414	2B

11582	3,634823	0B
11583	2,577633	0B
11584	192,5618	2B
11585	0,240952	0B
11586	3,154288	0B
11587	148,8399	2B
11588	48,4297	1B
11589	1,355764	0B
11590	67,1514	1B
11607	2,222841	0B
11608	0,357191	0B
11609	3,822461	0B
11610	2,540963	0B
11611	139,0086	2B
11612	3,272082	0B
11614	0,669267	0B
11615	307,563	2B
11617	1,495668	0B
11693	72,29123	1B
11694	35,69759	1B
11695	48,75986	1B
11696	58,27153	1B
11697	18,7357	1B
11698	2,924738	0B
11699	30,65076	1B
11700	25,32441	1B
11701	36,228	1B
11702	13,5203	1B
11703	0,87853	0B
11704	20,29365	1B
11705	14,969	1B
11707	2,246158	0B
11708	0,615768	0B
11709	145,7653	2B
11710	1,376778	0B
11711	1,765735	0B
11712	47,46664	1B
11713	3,335603	0B
11714	6,013398	0B
11715	22,17994	1B
11716	1,663474	0B
11853	49,44446	1B
11854	5,086617	0B
11855	1,478244	0B
11856	11,48855	1B
11857	42,43085	1B
11858	43,36191	1B
11859	12,22529	1B
11860	18,6906	1B
11862	7,235415	1B

11863	29,06244	1B
11864	0,766736	0B
11865	56,87054	1B
11866	3,104296	0B
11867	0,46262	0B
11868	1,001128	0B
11869	3,908321	0B
11870	0,928724	0B
11871	6,850924	0B
11872	12,70626	1B
11873	127,9039	2B
11874	0,976222	0B
11875	19,48807	1B
11876	3,779286	0B

Tabela 13: Amostras analisadas do cruzamento 04 (réplica 2) por qPCR

Indivíduo	RQ	Resultado
10199 (matriz fêmea)	64,225	1B
10200 (matriz macho)	91,465	1B
10361	1,288774	0B
10362	25,36909	1B
10363	10,26029	1B
10364	48,26818	1B
10365	16,57573	1B
10366	0,102522	0B
10367	15,81257	1B
10368	26,85278	1B
10369	273,0459	2B
10370	6,543212	1B
10371	62,90049	1B
10372	0,078781	0B
10373	0,171229	0B
10374	0,201102	0B
10375	0,19601	0B
10376	1,204137	0B
10378	13,63271	1B
10379	8,415214	1B
10381	22,36235	1B
10382	0,99654	0B
10383	0,138888	0B
10384	1,175276	0B
10385	128,7117	2B
10386	4,789916	1B
10387	0,182757	0B
10388	0,85653	0B
10389	135,6479	2B
10390	0,563042	0B
10391	1,164513	0B

10392	69,44128	1B
10393	38,01757	1B
10394	64,98048	1B
10395	63,25746	1B
10396	69,5565	1B
10397	51,36326	1B
10398	57,91754	1B
10399	152,4745	2B
10400	129,0685	2B
10401	73,34364	1B
10403	139,5029	2B
10404	0,914083	0B
10405	1,035345	0B
10406	41,53883	1B
10407	1,261764	0B
10408	1,124519	0B
10409	69,80385	1B
10411	139,1457	2B