

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/01/2020.

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 sequências 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.

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.