

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Cromossomos B no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE): estudos genéticos e modelagem de nicho

Sandro Natal Daniel

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Sandro Natal Daniel

Cromossomos B no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE): estudos genéticos e modelagem de nicho

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP,
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Dr. Fabio Porto-Foresti

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Daniel, Sandro Natal.

Cromossomos B no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE): estudos genéticos e modelagem de nicho /
Sandro Natal Daniel. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Fábio Porto Foresti
Capes: 20406002

1. *Astyanax* (Peixe). 2. Cromossomos - Polimorfismo.
3. Biogeografia. 4. Genética populacional.

Palavras-chave: Biogeografia; Cromossomos supranumerários;
Genética populacional; Modelagem genética; mtDNA D-loop.

“Nessa sociedade dita moderna nos acostumamos e nos deparamos rotineiramente com casas grandes, porém, recheadas de famílias pequenas; muitos diplomas pendurados e decorando paredes afora, mas com pouco senso comum; uma medicina avançada de tal modo como jamais pensada até poucas décadas atrás, entretanto, nos deparamos com uma saúde cada vez mais precária; hoje temos o privilégio de podermos conhecer o mundo sem ao menos precisar sair do sofá de casa, na palma da nossa mão, mas nem ao menos conhecemos o nosso vizinho; com tanta informação disponível, detemos cada vez mais conhecimento, e de forma contrária, temos cada vez menos sabedoria; nos cobramos e somos cobrados cada vez mais por maiores rendimentos, e da mesma forma, velocidade e intensidade, perdemos nossa paz de espírito; expomos relógios caríssimos nos pulsos e nossas agendas vivem lotadas, mas contraditoriamente vivemos reclamando que não temos tempo pra nada, estamos sem tempo para amar nossa família, ao próximo...sem tempo para amar a nós mesmos; temos mantido uma infinidade de amigos virtuais, mas não temos a capacidade de sentar com amigos reais para uma boa conversa; humanos, somos bilhões, mas quanto temos de humanidade?; Penso e repenso...quando foi que deixamos tudo isso tomar conta das nossas vidas? Quando deixamos de valorizar o que realmente importa? Dedicemos mais tempo à nossa felicidade, à nossa família, aos nossos amigos, pois a vida

*passa tão rápido, como um sopro! ela é como uma vela acesa, que de uma hora
pra outra pode se apagar. Um começo e um fim. Devemos entender que
nascemos sem nada, e da mesma forma, morremos sem levar nada, e no meio
desse intervalo, brigamos por aquilo que não trouxemos e tampouco levaremos.
Pensemos nisso...amemos mais, perdoemos mais, vivamos mais, sejamos cada
vez mais felizes e jamais deixemos que nossa felicidade dependa dos outros, pois
os outros jamais deixarão de ser felizes por você.”*

Dedico este trabalho à toda minha família, em especial meus pais Ana Francisca e Sebastião (in memoriam), minha esposa Ana Angélica e meu filho Miguel. Vocês foram, são, e sempre serão a grande motivação da minha vida. Obrigado por todo o amor e carinho a mim dispensados, eu os amo mais que tudo!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente agradeço à Deus, pelo dom da vida e privilégio de gozar de ótima saúde física-mental, ânimo, discernimento e força, mas agradeço principalmente pela capacidade de poder reparar meus erros e seguir em frente, sempre buscando ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha família, por todo apoio e amor incondicionais. Esse trabalho teria sido muito mais árduo sem o apoio de vocês...sintam-se parte dele tanto quanto eu. Muito obrigado por tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa para o desenvolvimento deste estudo, aqui representado como uma Tese.

Ao Prof. Dr. Fabio Porto Foresti: orientador, padrinho de casamento, e acima de tudo, meu amigo. Sou imensamente grato pelo apoio e incentivo ao longo dos meus quase 11 anos de Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe). Obrigado por me receber de braços abertos em seu laboratório, acreditar em minha capacidade de executar todas as tarefas em que me incumbiu, por dividir comigo um pouquinho da sua experiência e conhecimento sobre os diversos ramos da citogenética e genética de peixes, com total competência, paciência e amizade.

Aos amigos que encontrei ao longo dos 11 anos de LaGenPe da UNESP Bauru, os atuais e os que já se foram, em especial aos que compõe o quadro atual discente: Bruna (Bru), Diego (Sr. Digs), Fernanda (Fers), Manolo (Manolão), Caio Goes (Caião), Willian (Well), Caio (Caio mol), Raul, Carol, Roger, Lilian, Sheila, Luana, Ana Carolina e Vinícius pela amizade e momentos de descontração compartilhados.

Ao pesquisador, amigo e padrinho de casamento Dr. Diogo Teruo Hashimoto, por me acompanhar, ensinar e aconselhar durante boa parte da minha carreira acadêmica. Obrigado por todo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Tiago da Silveira Vasconcelos, da Faculdade de Ciências da Unesp Bauru, pela vital ajuda na programação, confecção e interpretação das modelagens de nicho utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por ser a pessoa mais otimista que já conheci, sempre ensinando e ajudando em qualquer que seja a situação, nos premiando com seu conhecimento, amor e dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira, pelos tecidos fornecidos e pelo seu exemplo ímpar de vida acadêmica.

Aos docentes e discentes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP Botucatu, sempre dispostos a ajudar, me fornecendo material biológico, reagentes, equipamento e toda sua infra-estrutura.

Aos amigos Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva e Ricardo Utsunomia, do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP Botucatu, pelas discussões construtivas, parcerias e pelo material biológico e reagentes cedidos para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Bruno Francelino de Melo, do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP Botucatu, pela ajuda na escolha e execução de alguns softwares utilizados neste trabalho.

Ao amigo Bruno Lopes da Silva Ferrete, do Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Campus da Baixada Santista, por todo apoio na execução e interpretação dos resultados populacionais.

Aos amigos graduandos, pós graduandos, servidores e docentes da Unesp Bauru e Botucatu, em especial o Departamento de Ciências Biológicas da Unesp Bauru, pelo cordial apoio sempre que necessário.

À seção técnica de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do IBB Botucatu, pela disposição, agilidade e rapidez em ajudar sempre que solicitados.

Ao Projeto Sorrir Bauru e todos seus voluntários, por me ensinarem ao longo dos meus quase 3 anos de voluntariado, o real significado do amor ao próximo. Obrigado por me tornarem uma pessoa melhor através das diversas visitas aos sábados à tarde. Estes momentos se convertem num bem muito maior a mim do que aos visitados,

pois através de seus agradecimentos, nos estendem um atestado de carinho e respeito simplesmente por ser fruto de uma boa intenção, e isso não tem preço.

À todos os familiares paternos e maternos de minha esposa, que me acolheram de braços abertos desde o início de nosso namoro, sem titubear, me oferecendo amor, carinho e respeito.

Aos meus sogros, Antônio Valdir de Souza e Therezinha Rocha de Souza, por me apresentarem com sua filha e por me acolherem tão bem em suas vidas. Sinto-me honrado e grato por tudo isso.

Por fim, agradeço à minha esposa, cúmplice, confidente e amiga Ana Angélica Rocha de Souza Daniel, por me acompanhar e apoiar em todos os momentos. Todos os dias quando acordo e olho seu rosto, penso: como é lindo e grandioso o brilho que você irradia, brilho este que me guia e me impulsiona a seguir em frente, com prazer, entusiasmo e alegria. Obrigado por ter me aceitado como seu marido, mesmo com meus inúmeros defeitos; obrigado por sempre ressaltar minhas qualidades, me ensinando que a cada dia temos a oportunidade de um recomeço melhor. Obrigado pelo simples fato de você existir em minha vida, e por me deixar fazer parte da sua; obrigado por me presentear com o nosso filho maravilhoso, nosso milagre chamado Miguel. Te amo muito meu moreco, meu eterno diamante rosa.

RESUMO

Dentre os peixes Neotropicais, o gênero *Astyanax* é caracterizado como um dos mais comuns e diversificados, representado por 147 espécies, das quais pelo menos 12 destas espécies têm demonstrado a presença de elementos adicionais denominados cromossomos B em seu genoma. No entanto, muitas vezes estas informações encontram-se dispersas ou fragmentadas. Assim, no presente estudo reportamos a diversidade de cromossomos B no gênero *Astyanax*, projetando nichos ecológicos preferenciais entre as espécies e populações B+ e B- do grupo em cenários do passado (Last Glacial Maximum - LGM: 22.000 e Mid-Holoceno - MD: 6.000 anos atrás), presente e futuro (2.060), além de análises populacionais de *A. bockmanni* a partir do mtDNA D-loop. Os períodos LGM e MH registraram ampla ocorrência de populações B+ e B- em boa parte das regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e parte da Bahia. No presente observamos áreas favoráveis B+ e B- quase que exclusivamente em parte de SP, MG, PR, RJ, MT e ES. Para 2.060, verificamos áreas preferenciais B+ quase que exclusivamente em parte de MG, RJ e SP. Quando sobrepostos, os cenários indicam um acúmulo das populações B+ em uma mesma área, padrão não observado nas populações B-, sugerindo que a região sobreposta poderia representar uma zona climaticamente estável para populações B+ desde o LGM, já que nenhuma população B- foi mantida nesta região. Análises qPCR indicaram a presença de cromossomos B_M em seis populações de *A. bockmanni*. A partir do mtDNA D-loop em 16 populações de *A. bockmanni* B+ e B-, verificamos que todas apresentam elevada estruturação genética, porém baixo fluxo gênico. As análises de variância molecular indicaram considerável diferenciação genética entre todas as populações e bacias, também refletidos nos diferentes dendogramas, reforçando a ideia de que *A. bockmanni* é um complexo de espécies.

Abstract

Among the Neotropical fish, the genus *Astyanax* is characterized as the most common and diversified, represented by 147 species, of which at least 12 of these species have demonstrated the presence of additional elements denominated B chromosomes in their genome. However, this information is often scattered or fragmented. Thus, in the present study we report the diversity of B chromosomes in the *Astyanax* genus, projecting preferential ecological niches among the species and B+ and B- populations of the group in scenarios of the past (Last Glacial Maximum - LGM: 22.000 and Mid-Holocene - MD: 6.000 years ago), present and future (2.060), in addition to population analyzes of *A. bockmanni* from the mtDNA D-loop. The LGM and MH periods recorded a large occurrence of B+ and B- populations in most of the Southeast, North, Central West regions and part of Bahia State. In the present we observed favorable areas B+ and B- almost exclusively in part of SP, MG, PR, RJ, MT and ES. For 2.060, we see B+ preferred areas almost exclusively in part of MG, RJ and SP States. When overlapping, the scenarios indicate an accumulation of B+ populations in the same area, a pattern not observed in B- populations, suggesting that the overlapping region could represent a climatically stable zone for B+ populations since the LGM period, since no B- population was maintained in this region. qPCR analyzes indicated the presence of B_M chromosomes in six *A. bockmanni* populations. From the D-loop mtDNA in 16 *A. bockmanni* populations of B+ and B-, we found that all have high genetic structuring, but low gene flow. Analyzes of molecular variance indicated considerable genetic differentiation among all populations and basins, also reflected in the different dendrograms, reinforcing the idea that *A. bockmanni* is a complex of species.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da família Characidae e o gênero <i>Astyanax</i>	1
1.2 Cromossomos B: ênfase no gênero <i>Astyanax</i>	3
1.3 mtDNA	14
1.4 Modelagem de nicho	17
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E METODOLOGIA	23
3.1 Material	23
3.1.1 Dados da espécie estudada	23
3.2 Métodos	24
3.2.1 Estimulação de mitoses	24
3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos <i>in vivo</i>	25
3.2.3 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)	26
3.2.4 Estudos cariotípicos	27
3.2.5 Extração do DNA genômico total	27
3.2.6 Amplificação do mtDNA D-loop	29
3.2.6.1 Purificação do produto PCR D-loop mtDNA com a enzima Exo-SAP	29
3.2.6.2 Preparação da placa de sequenciamento	30
3.2.6.3 Purificação das amostras utilizando EDTA/Acetato de sódio/Etanol	31
3.2.6.4 Sequenciamento do DNA	31
3.2.7 Análises das sequências de mtDNA obtidas	32
3.2.8 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	34
3.2.9 Modelagem do nicho preferencial	36
3.2.10 Quantum GIS copiapó	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Capítulo 1	41
4.2 Capítulo 2	60
4.3 Capítulo 3	86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
7 FIGURAS E TABELAS COMPLEMENTARES	150

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais da família Characidae e o gênero *Astyanax*

Dentre os peixes continentais, as espécies que compreendem a região Neotropical são bastante diversificadas, reportadas desde a América Central até o sul da América do Sul, superando 7 mil espécies distribuídas entre 71 famílias (Albert e Reis, 2011). Nesse sentido, dois grupos têm recebido maior destaque: Characiformes e Siluriformes (Eschmeyer e Fong, 2017). Os peixes da ordem Characiformes exibem grande variedade de formas e tamanhos corporais, habitando lagos e rios do continente africano e região neotropical (Géry, 1977), compreendendo formas herbívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas (Britisk *et al.*, 1972). Characidae é uma das mais numerosas e complexas famílias de peixes Neotropicais (Nelson, 2006), com aproximadamente 1100 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2017). Dentre os Characidae, o gênero *Astyanax* caracteriza-se como um dos mais diversificados (Lucena *et al.*, 2013), com 154 espécies reconhecidas (Eschmeyer, 2017), das quais 34 foram descritas nos últimos 10 anos (Rossini *et al.*, 2016), habitando quase todos os ambientes dulcícolas, com preferência às cabeceiras de rios, riachos e córregos (Garutti e Britski, 2000; Vari e Castro, 2007), abundantes na maioria das bacias hidrográficas brasileiras (Lima *et al.*, 2003).

De uma forma geral, as espécies pertencentes a este grupo apresentam uma diversidade acentuada quanto ao número diplóide, desde $2n=36$ cromossomos em *A. schubarti* (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001; Moreira-Filho *et al.*, 2001) a $2n=50$ cromossomos em *A. paranae* (Silva *et al.*, 2014, 2016), com ampla variação quanto à morfologia e distribuição cromossômicas interpopulacionais, presença de cromossomos

supranumerários, triploidia natural, dentre outras (Fauaz *et al.*, 1994; Mestriner *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2012, 2015b; Silva *et al.*, 2013, 2016), as quais, podem estar relacionadas à altitude, diferenciação sexual ou ainda poluição ambiental (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Néo *et al.*, 2000).

Nesse sentido, estudos sistemáticos têm enfatizado que representantes deste grupo compõem complexos de espécies de taxonomia controversa (Reis *et al.*, 2003), bem como inúmeras espécies do gênero *Astyanax* tratadas somente como *Astyanax spp.* (Pie *et al.*, 2009). Somado a isso, diversos autores indicam a existência de complexos de espécies: complexos *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), *A. fasciatus* (Artoni *et al.*, 2006), *A. bimaculatus* (Paiva *et al.*, 2006) e *A. hastatus* (Kavalco *et al.*, 2009), e *A. bockmanni*, recentemente proposto por Daniel *et al.*; 2015a). Para se ter uma ideia, somente para o complexo *A. scabripinnis*, análises citogenéticas e morfológicas sugerem que este complexo seria composto por pelo menos 15 espécies (Bertaco e Lucena, 2006).

Assim, considerando a intensa variabilidade cariotípica inter e intraespecíficas, ampla distribuição geográfica (Zanata e Camelier, 2009), alta plasticidade fenotípica, grande capacidade de se adaptar aos mais diversos ambientes (Dowling, 2002), rápida especialização ecológica e diferenciação morfológica em representantes do gênero *Astyanax* (Hashimoto *et al.*, 2011), estudos citogenéticos, biogeográficos, evolutivos e filogenéticos representam excelentes ferramentas para um melhor conhecimento da sistemática desse grupos de peixes, contribuindo de forma significativa para um melhor entendimento dos processos envolvidos na diferenciação, manutenção e evolução de algumas características genéticas predominantemente particulares à algumas espécies do grupo.

1.2 Cromossomos B: ênfase no gênero *Astyanax*

Características Gerais

Desde a sua descoberta no início do século passado por Wilson em 1907, cromossomos B têm sido intensamente estudados nos mais diversos organismos. De acordo com a mais recente revisão sobre cromossomos B, estes elementos adicionais são descritos em 1685 eucariotos, sendo 406 novos registros nos últimos 35 anos (Jones, 2017). Porém, a estrutura, função e ação destes elementos adicionais no genoma ainda são completamente particulares entre os diferentes grupos (Oliveira *et al.*, 1997).

Uma das principais características dos cromossomos B é o seu não pareamento ou recombinação com os cromossomos do complemento diploide ou poliploide durante a meiose, exceto em alguns poucos casos onde se observou translocações entre cromossomos A e B, como em centeio (Pohler e Schlegel, 1990) e em milho (Auger e Birchler, 2002), e diversos estudos têm mostrado que cromossomos B são formados principalmente por famílias multigênicas, satDNAs e elementos transponíveis (Valente *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2015b; Silva *et al.*, 2016, 2017; Utsunomia *et al.*, 2016; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Douglas e Birchler, 2017; Barbosa *et al.*, 2017).

O termo “Cromossomo B” inclui uma variedade de formas e tamanhos de cromossomos extras, os quais exibem heterogeneidade conspícua com natureza, comportamento e dinâmica evolutiva própria. Por esta razão, não é fácil buscar uma definição geral destes elementos genômicos (Camacho, 2005). Assim, algumas das mais importantes propriedades universais destes cromossomos são: *a)* trata-se de elementos dispensáveis (i.e não são necessários para o ciclo de vida normal do genoma hospedeiro); *b)* sua origem seria a partir de cromossomos do complemento padrão (A) (originário da mesma espécie ou de espécies diferentes); *c)* não se recombina com

cromossomos do conjunto padrão (A). Nesse sentido, Houben *et al.* (2013) definem cromossomos B (ou supranumerários) como elementos adicionais ao conjunto de padrão, os quais não apresentam herança mendeliana, e podem variar numérica e morfológicamente, de forma inter e intraindividual entre as espécies e populações portadoras (Douglas e Birchler, 2017). Além disso, são amplamente distribuídos entre animais, plantas e fungos, entretanto, desde a sua descoberta ainda são tidos como um mistério evolutivo (Camacho, 2005).

Durante a meiose, os cromossomos autossômicos homólogos se pareiam formando bivalentes que posteriormente se segregam na primeira divisão. Em contraste, nem sempre existe pareamento entre os cromossomos B, e sua invasão e manutenção no genoma são resultados de um comportamento individual do tipo univalente (Camacho, 2005). Ao invés de se dividirem de acordo com o modelo mendeliano, os univalentes são livres para se segregarem, preferencialmente, para um pólo meiótico específico, resultando em um padrão de transmissão maior que a expectativa mendeliana (Camacho, 2005). Diante destes diferentes modelos de transmissão os cromossomos B são considerados os elementos genéticos parasitas mais conhecidos no genoma (Camacho, 2005). Devido a esta irregularidade quanto ao comportamento meiótico os cromossomos B apresentam uma forte tendência em se acumular.

Durante muito tempo cromossomos B foram considerados elementos não funcionais dispensáveis às espécies (Houben, 2017), entretanto com o crescente avanço tecnológico, informações mostrando um lado ainda pouco conhecido desta classe cromossômica têm surgido. Em *A. latifasciata*, foram isoladas sequências gênicas alocadas em indivíduos com e sem cromossomos B, projetando uma origem comum destes elementos entre espécies de ciclídeos africanos do Lago Vitória (África), os quais teriam se formado a partir de um fragmento autossômico. Posteriormente, este

cromossomo B ancestral teria sofrido uma invasão de sequências genômicas de indivíduos de diversas localidades. (Valente *et al.*, 2014). Ainda sobre ciclídeos africanos do Lago Vitória, Carmello *et al.* (2017) identificaram uma variante do gene *hnRNPQ* inserido no cromossomo B de *A. latifasciata*, além de variações os resultados nos níveis de expressão entre os tecidos, sexo e entre a relação presença/ausência de cromossomos B, observadas através de RT-qPCR. Ainda segundo os autores, os resultados levantados sugerem que a reinserção aparentemente seja um importante mecanismo adicional que contribui para a formação do cromossomo B, sugerindo que em ciclídeos, cromossomos B estejam de alguma forma, associados à determinação sexual. Em *M. sanctaefilomenae*, Utsunomia *et al.* (2016) sugerem que a origem dos cromossomos B desta espécie teria ocorrido a partir de fragmentos do par cromossômico seis, resultando atualmente em dois morfotipos de cromossomos B independentes.

Especificamente sobre genes transcritos em cromossomos B, Miao *et al.* (1991) relataram de forma pioneira evidências de genes transcritos em supranumerários presentes no fungo *Nectria haematococa*. Após, diversos autores revelaram genes que codificam proteínas transcritos em cromossomos B: na planta *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005), espécies de canídeos (Yudkin *et al.*, 2007), nos gafanhotos *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010) e *Eyprepocnemis plorans* (Ruíz-Estévez *et al.*, 2012, 2013; Navarro-Domínguez *et al.*, 2017), nos peixes *Rhammatocerus brasiliensis* (Oliveira *et al.*, 2011) e no ciclídeo *Lithochromis rubripinn* (Yoshida *et al.*, 2011), além de sequências transcritas especificamente em cromossomos B de centeio (Carchilan *et al.*, 2009) e veado siberiano *Capreolus pygargus* (Trifonov *et al.*, 2013). Mais recentemente, Li *et al.* (2017) investigaram populações naturais da vespa *Nasonia vitripennis* cujo cromossomo B é transmitido paternalmente através de um processo

denominado razão sexual paterna (PSR, sigla em inglês). Para facilitar sua própria transmissão, o PSR prejudica severamente a proporção sexual macho/fêmea, interrompendo os processos iniciais de remodelação da cromatina. Através do perfil de transcrição, os autores identificaram múltiplas repetições de DNA exclusivamente associadas à PSR, a maioria das quais, mapeadas para uma única repetição específica de PSR, expressa em níveis muito mais elevados que as decorrentes de repetições ligadas aos cromossomos A. Segundo Banaei-Moghaddam *et al.* (2013) cerca de 15% de todos os fragmentos de pseudogenes alocados em cromossomos B seriam transcritos, demonstrando que alguns cromossomos B, mesmo heterocromáticos, podem abrigar genes funcionais (Ruíz-Estévez *et al.*, 2013). Logo, cromossomos B podem não ser geneticamente tão inertes como se acreditava (Yoshida *et al.*, 2011), onde o acúmulo de sequências repetitivas em cromossomos B parece ter fundamental importância na sua diferenciação (Camacho, 2005).

Cromossomos B no gênero Astyanax

Em peixes, supranumerários são reportados em pelo menos 113 espécies (D'Ambrosio *et al.*, 2017), das quais 38 são peixes neotropicais, ou seja, 1,5% de todos os peixes cariotipados desta região (revisão em Oliveira *et al.*, 2009). Especificamente em *Astyanax* há a incidência de cromossomos B em pelo menos 12 espécies (incluindo uma subespécie): *A. scabripinnis paranae* (Maistro *et al.*, 1992), *A. scabripinnis* (Maistro *et al.*, 1994), *A. fasciatus* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. schubarti* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. sp. B* (Fazoli *et al.*, 2003), *A. mexicanus* (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007), *A. altiparanae* (Hashimoto *et al.*, 2008), *A. eigenmanniorum* (Torres-Mariano e Morelli, 2008), *A. bockmanni* (Hashimoto *et al.*, 2011), *A. goyacensis* (Santos *et al.*, 2013), *A. paranae* (Abelini *et al.*, 2014) e *A. jordani* (Silva *et al.*, 2015),

conforme reportado na tabela 1. Entretanto, apesar desta elevada recorrência em espécies do grupo, não há evidências de que a presença de cromossomos B configure vantagens significativas aos organismos que os mantém.

Dentre as diversas hipóteses levantadas para explicar a origem de cromossomos B em peixes, principalmente *Astyanax*, Maistro *et al.* (1999) propõe que o cromossomo B_M reportado em *A. scabripinnis paranae* teria se originado a partir da não-disjunção do primeiro par de cromossomos metacêntricos, que teria formado um elemento trissômico que posteriormente seguiu seu próprio caminho evolutivo. Paralelamente, Mestriner *et al.* (2000) verificaram que o cromossomo B_M de *A. scabripinnis* formava univalentes durante a fase meiótica através do auto-pareamento de seus braços, seguida da não-disjunção das cromátides do par cromossômico 24. Por conta disso, não seguiria os padrões de herança mendeliana, hipótese posteriormente corroborada por Vicari *et al.* (2011) com base em testes de hibridação efetuados em células paquítenas de *A. scabripinnis*.

Tabela 1: relação das populações de todas as espécies do gênero *Astyanax* reportadas como portadoras de cromossomos B.

Espécie	N/tamanho B	Município/Estado	Referência
<i>Astyanax altiparanae</i>	1 B _a	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2008
<i>A. altiparanae</i>	1B _a	Bauru, SP	Este estudo
<i>Astyanax bockmanni</i>	1B _M	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2016
<i>A. bockmanni</i>	1 B _a	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011
<i>A. bockmanni</i>	1-2 B _a	Paulistânia, SP	Este estudo
<i>A. bockmanni</i>	1 B _M / 1 B _m / 2 B _a	Bauru, SP	Daniel <i>et al.</i> , 2012
<i>Astyanax goyacensis</i>	1-9 B _m / B _a	Monte do Carmo, TO	Santos <i>et al.</i> , 2013
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	1-2 B _M	Uberlândia, MG	Torres-Mariano e Morelli, 2008
<i>Astyanax fasciatus</i>	1 B _M / 1 B _{SM} / 1B _{ST}	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Ferreira-Neto <i>et al.</i> , 2012
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Mogi Guaçu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. fasciatus</i>	1-2 B _A	Bauru, SP	Este estudo
<i>A. fasciatus</i>	1B _A	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Três Marias, MG	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 2001
<i>A. fasciatus</i>	1-2 B _{ST}	Bauru, SP	Este estudo
<i>Astyanax paranae</i>	1 B _M / 1 B _{SM}	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. paranae</i>	1 B _M	Maringá, PR	Abelini <i>et al.</i> , 2014
<i>Astyanax scabripinnis</i>	1 B _M	Maringá, PR	Abelini <i>et al.</i> , 2014
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _{SM}	Itirapina, SP	Souza <i>et al.</i> , 1995
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Castro <i>et al.</i> , 2014
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M / 1 B _{SM} / 1 B _{ST} / 1 B _A	Maringá, PR	Fernandes e Martins-Santos, 2005
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _M	Campos do Jordão, SP	Salvador e Moreira-Filho, 1992
<i>A. scabripinnis</i>	2 B _M / 1 B _{SM}	Campos do Jordão, SP	Néo <i>et al.</i> , 2000
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Campos do Jordão, SP	Mestriner <i>et al.</i> , 2000
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M / 1-2 B _{SM}	Campos do Jordão, SP	Ferro <i>et al.</i> , 2003
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _m	Paranavaí, PR	Alves e Martins-Santos, 2002
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Castro <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Maringá, PR	Castro <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Barbosa <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _M	Botucatu, SP	Machado <i>et al.</i> , 2012
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Maistro <i>et al.</i> , 2001
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _a	Cerqueira César, SP	Mizoguchi e Martins-Santos <i>et al.</i> , 1997
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Floresta, PR	Mizoguchi e Martins-Santos <i>et al.</i> , 1997
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Porto-Foresti <i>et al.</i> , 1997
<i>A. scabripinnis paranae</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Maistro <i>et al.</i> , 1992
<i>Astyanax schubarti</i>	1 B _M	Missiones, Ar	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 2000
<i>Astyanax</i> sp. B	1 B _M / 1 B _{SM} / 1 B _a	Capitão Leônidas Marques, PR	Fazoli <i>et al.</i> , 2003
<i>Astyanax jordani</i>	1B _m	aquariofilia	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Astyanax mexicanus</i>	1 B _a	aquariofilia	Kavalco e Almeida-Toledo, 2007

Em relação ao tamanho, destacamos vários exemplos que os supranumerários podem ocupar em peixes: macrocromossomos B em espécies e populações de *Astyanax*

(Maistro *et al.*, 1992; Néo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001, 2004; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; 2016); supranumerários de tamanho médio em representantes do gênero *Rhamdia* (Fenocchio *et al.*, 2000); ou ainda microcromossomos B em *Prochilodus* (Artoni *et al.*, 2006; Voltolin *et al.*, 2010, 2013; Penitente *et al.*, 2013, 2016). Em relação aos morfotipos de supranumerários reportados em *Astyanax*, a variante B_M de *A. scabripinnis*, similar ao maior cromossomo do complemento A, é a que têm apresentado maior recorrência (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Além disso, fortes evidências sugerem que o morfotipo B_M trata-se de um isocromossomo, com homologia funcional e estrutural entre seus dois braços. As variantes B_{SM} e B_m (um grande submetacêntrico e um pequeno metacêntrico, respectivamente) representariam ocorrências raras, provavelmente derivadas de rearranjos estruturais do B_M. Adicionalmente, microcromossomos B são reportados de forma esporádica, apenas em algumas populações de determinadas espécies (Moreira-Filho *et al.*, 2004), de acordo com a figura 1.

Em *A. paranae*, Silva *et al.* (2014) microdissecaram um dos braços do cromossomo B_M metacêntrico, amplificando seu material genômico e produzindo uma sonda B-específica do braço isolado. Posteriormente, aplicaram a *FISH* em células metafásicas que continham o cromossomo B inteiro, constatando uma pintura cromossômica total do supranumerário, ou seja, características correspondentes a de um isocromossomo. Em outro estudo envolvendo a espécie *A. bockmanni*, Daniel *et al.* (2012) propõem que o supranumerário desta espécie também seria um isocromossomo, uma vez que os autores registraram a ocorrência simultânea de um macrocromossomo B metacêntrico e um microcromossomo B acrocêntrico, pré requisitos para tal inferência. Mais recentemente, Silva *et al.* (2017) confirmaram a origem isocromossômica para ambas espécies através de marcadores satDNA.

	<i>Astyanax bockmanni</i> - B _M /B _m (macro/micro) <i>A. schubarti</i> - B _M (macro) <i>A. fasciatus</i> - B _M (macro) <i>A. paranae</i> - B _M (macro) <i>A. scabripinnis</i> - B _M /B _m (macro/médio/micro) <i>A. eigenmanniorum</i> - B _M (macro) <i>A. jordani</i> - B _m (micro) <i>A. sp. B</i> - B _M (macro)
	<i>A. fasciatus</i> - B _{sm} (médio) <i>A. paranae</i> - B _{SM} (macro) <i>A. scabripinnis</i> - B _{SM} /B _{sm} (macro/médio) <i>A. sp. B</i> - B _{SM} (macro)
	<i>A. fasciatus</i> - B _{st} (médio) <i>A. scabripinnis</i> - B _{ST} (macro)
	<i>A. bockmanni</i> - B _a (micro) <i>A. altiparanae</i> - B _a (micro) <i>A. goyacensis</i> - B _A /B _a (macro/médio/micro) <i>A. fasciatus</i> - B _a (médio) <i>A. scabripinnis</i> - B _A /B _a (macro/micro) <i>A. mexicanus</i> - B _a (micro) <i>A. sp. B</i> - B _a (acro)

Figura 1: morfologias e tamanho de cromossomos B reportados entre as espécies do gênero *Astyanax*.

Hipóteses sobre a origem dos Cromossomos B

Muitas hipóteses já foram postuladas na tentativa de explicar uma possível origem dos cromossomos B, dentre as quais, existem duas que são mais recorrentemente reportadas e aceitas: origens intra e interespecíficas. A hipótese de origem intraespecífica se arrasta desde as primeiras análises realizadas nas décadas de 1970 e 1980, que demonstraram que os cromossomos B continham DNA semelhante ao encontrado no complemento A (Camacho *et al*, 2000), levando à formulação da mais tradicional e amplamente aceita versão de que os cromossomos B são derivados dos cromossomos A (Jones e Rees, 1982). Nesta perspectiva, considera-se a origem do cromossomo B como um simples subproduto da evolução do cariótipo padrão (Camacho *et al*, 2000), ou seja, poderia se originar do próprio conjunto polissômico autossômico, a partir de fragmentos cêntricos resultantes de fusões ou

amplificação da região paracentromérica de fragmentos de cromossomos A. Uma evidência que favorece esta hipótese foi obtida por Keyl e Hagele (1971), onde os padrões de banda nos cromossomos B de *Chironomus plumosus* eram similares à região centromérica do quarto par cromossômico. Além disso, variáveis da teoria intra-específica obtiveram um enorme embasamento nos estudos de cromossomos B em peixes, com diversos autores propondo a origem dos cromossomos B por isocromossomo (Mestriner *et al.*, 2000; Néo *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014, 2017).

Na segunda hipótese, de origem interespecífica (Camacho *et al.*, 2000; Perfectti e Werren, 2001), os cromossomos B teriam surgido a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização. A origem do cromossomo B como decorrência de processo de hibridização foi reportada por Perfectti e Werren (2001) ao observarem a presença de cromossomos supranumerários em uma linhagem de vespas do gênero *Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre as espécies *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*. Por outro lado, uma origem dos cromossomos B a partir de cromossomos sexuais também tem sido proposta, principalmente em alguns gêneros de gafanhotos (Camacho, 2005).

Em outros organismos, diversos autores têm efetuado buscas intensas na tentativa de explicar possíveis origens de supranumerários. Teruel *et al.* (2010) observaram sequências das histonas H3 e H4 associadas à cromossomos autossomos e supranumerários do gafanhoto *Locusta migratoria*, sugerindo que os cromossomos B desta espécie poderiam ter se originado a partir do cromossomo 8 desta espécie. Já Muñoz-Pajares *et al.* (2011) desenvolveram marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) B-específicos (B-SCAR) de *Eyprepocnemis plorans*, observando um compartilhamento de duas sequências entre os cromossomos A e B,

propondo uma origem intraespecífica destes B. Tosta *et al.* (2015) dispendo de marcadores B-SCAR, demonstraram que os cromossomos B reportados em diversas espécies de vespas do gênero *Partamona* inicialmente teriam se originado em apenas uma das espécies, tendo sido transmitido às outras por meio de introgressões. Dispendo dos mesmos marcadores B-SCAR, Machado *et al.* (2016) identificaram traços deste marcador em outras seis espécies de *Partamona*, corroborando a hipótese de que estes supranumerários teriam se originado por introgressão.

Dinâmica evolutiva dos Cromossomos B

De acordo com a presença de mecanismos de acumulação e seus possíveis efeitos, dois modelos de equilíbrio são propostos. *a)* o modelo heterótico aponta para um balanço entre os efeitos positivos dos cromossomos B nas formas hospedeiras, quando eles ocorrem em baixo número e efeitos negativos quando eles ocorrem em alto número (White, 1973); *b)* o modelo parasítico proposto por Östergren (1945) e Nur (1966), ou modelo egoísta (Jones, 1985), assume que os cromossomos B são mantidos na população por meio de mecanismos de acumulação, os quais contrabalanceiam seus efeitos deletérios no genoma hospedeiro.

Há ainda, um modelo de não equilíbrio da evolução dos cromossomos B a longo prazo proposto por Zurita *et al.* (1998). Neste modelo um cromossomo B parasítico, ao perder seu mecanismo de acumulação, estaria destinado a desaparecer de modo rápido, lento ou muito lento da população, em um longo processo de extinção ao acaso. Posteriormente, uma nova variante de cromossomo B poderia aparecer, reiniciando o ciclo (Herrera *et al.*, 1996). De acordo com Camacho *et al.* (2000), o ciclo de vida dos cromossomos B nas populações portadoras compreende três fases: invasão, neutralização e extinção (para maiores detalhes vide figura 2). Na fase neutra os

supranumerários sofrem grandes mutações em suas sequências de DNA para novamente reiniciar seu ciclo, caso contrário, estarão fadados à extinção, consequentemente, desaparecendo da população. Logo, condições de acúmulo, neutralização e extinção dos supranumerários estariam relacionadas ao seu modo de transmissão entre as gerações (Camacho, 2005).

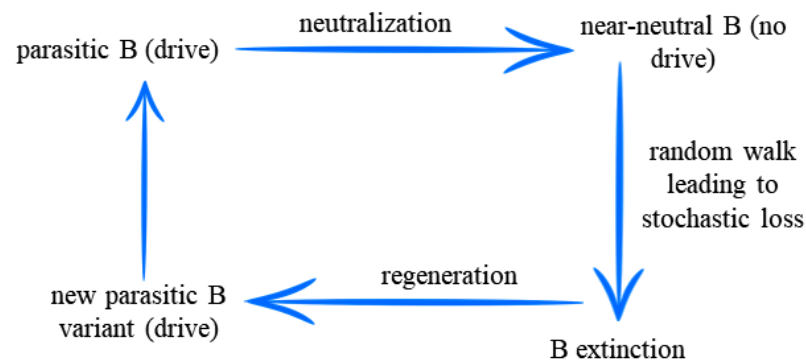


Figura 2: Modelo parasítico do ciclo dos cromossomos. Adaptado de Camacho *et al.* (2000).

Em suma, o aumento da instabilidade meiótica acarretaria acúmulo destes elementos extras na natureza, e todo o acúmulo seria ligado à um padrão de transmissão acima da perspectiva mendeliana. Por outro lado, se os cromossomos B atingirem uma estabilidade meiótica, o padrão de transmissão deverá ser coerente com a expectativa mendeliana, repercutindo na fase de neutralização conforme observado neste trabalho. Por fim, se registrada uma diminuição da frequência dos elementos B nas gerações, seu padrão de transmissão encontrar-se-á abaixo da expectativa mendeliana, favorecendo a extinção destes elementos na população portadora.

1.3 DNA mitocondrial como marcador molecular

Dentre os diversos estudos envolvendo genética molecular, têm se destacado os que relacionam informações baseadas em mtDNA (Melo *et al.*, 2014, 2016). Dos genes

mitocondriais mais costumeiramente utilizados, encontram-se os que são codificadores da Citocromo Oxidase I (COI), Citocromo Oxidase II (COII) e Citocromo b (Cytb), os quais têm permitido estudos populacionais, de filogenia e filogeografia de diversos grupos, principalmente peixes (Melo *et al.*, 2016b,c). Adicionalmente, o gene codificador da proteína COI e COII, referentes a sequências mais conservadas em termos evolutivos, têm sido amplamente utilizados como um “DNA barcoding” na diferenciação e identificação de espécies animais (Rossini *et al.*, 2016). Por exemplo, a região controle do mtDNA D-loop normalmente é voltada à estudos populacionais, enquanto o Citocromo b, é geralmente utilizado para análises em táxons acima do nível de espécie (Pereira, 2000, Ferrette *et al.*, 2015; O'Leary *et al.*, 2015).

Adicionalmente, o genoma mitocondrial detém diversas particularidades, como a capacidade de codificar praticamente as mesmas proteínas desde leveduras até mamíferos, entretanto apresentando organizações gênicas distintas dentre os organismos (Boore, 1999), e extremamente conservado em alguns grupos de vertebrados, arranjados em uma molécula anelar (Johansen *et al.*, 1990). Em peixes, embora incomuns, recombinação e rearranjos na organização do genoma mitocondrial são observados (Miya *et al.*, 2003; Mabuchi *et al.*, 2004), dentre eles, linguado (Hoarau *et al.*, 2002) e carpa (Guo *et al.*, 2006). Em vertebrados de uma forma geral, sequências de mtDNAs são pequenas (entre 15 e 20 kb) e compactas (Pereira, 2000), onde a região controle, também chamada D-loop (figura 3), é a responsável pela variação de tamanho dessa molécula, e exibe a maior taxa de substituição entre todo o DNA mitocondrial (Heist, 2005). Por ter uma taxa evolutiva entre duas e cinco vezes mais rápida que o restante do genoma mitocondrial (Meyer, 1993), esta região fornece informações genéticas que permitem inferir relações entre táxons próximos e a história de populações através de

estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura de populações (Avise, 1994).

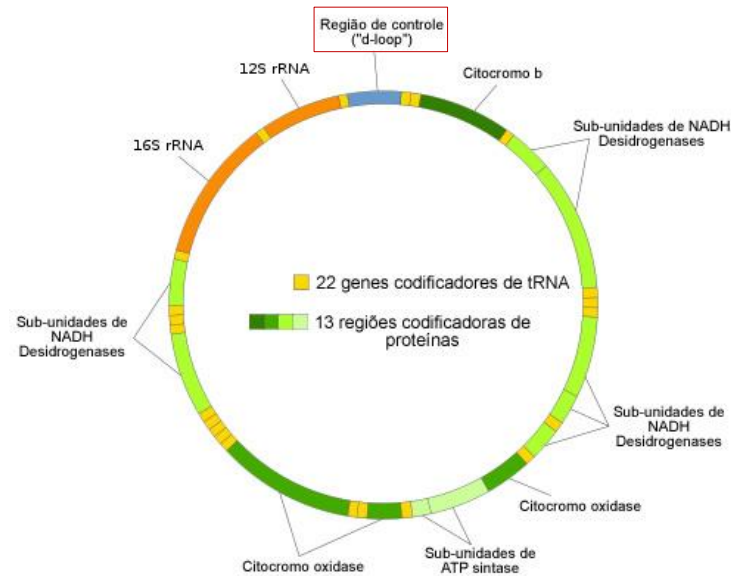


Figura 3: Esquema representativo circular do genoma mitocondrial de vertebrados, destacando a região D-loop. Adaptado de Shadel e Clayton (1997).

Dessa forma, a utilização do mtDNA é considerada vantajosa porque a maioria das espécies apresenta algum grau de estruturação genética para este marcador (Avise, 2004). Tal padrão compartimentalizado é resultado de sua herança uniparental (Brown *et al.*, 1982), que leva à populações efetivamente menores (Avise, 2004; Ballard e Whitlock, 2004). Em outras palavras, significa que as linhagens tendam a um monofiletismo recíproco mais rápido em locos mitocondriais se comparado aos nucleares (Brown *et al.*, 1986). Por outro lado, a elevada taxa evolutiva deste marcador é sua característica mais atraente para estudos populacionais e filogenéticos, permitindo, traçar histórias evolutivas de eventos recentes, como especiação, estima da estrutura populacional, eventos de hibridização, fluxo gênico, dentre outros (Meyer, 1994; Clabaut *et al.*, 2005). Além disso, moléculas de mtDNA não possuem histonas

associadas, favorecendo sua alta taxa de mutação, consequentemente, justificando sua ampla utilização em estudos microevolutivos (Wolfe *et al.*, 1987).

Em populações do *Negaprion brevirostris* amostradas ao longo da costa do Brasil, Bahamas e Guiné Bissau, Schultz *et al.* (2008) identificaram fortes restrições do fluxo gênico, além de caracterizar os níveis de variabilidade genética em cada uma delas. Similarmente, por meio de marcadores mtDNA, Mendonça *et al.* (2013) reportaram forte estruturação populacional entre tubarões *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii* do Atlântico Ocidental. Em outro estudo, O'Leary *et al.* (2015) utilizaram sequências D-loop para avaliar a diversidade genética do tubarão branco *Carcharodon carcharias* no Noroeste Atlântico e na África do Sul, identificando a ocorrência de duas populações geneticamente distintas.

No caso dos peixes Neotropicais, aproximadamente ¼ de todas as espécies do planeta coexistem nessa região (Schaefer, 1998). Nesse sentido, a partir da última década o mtDNA passou a ser utilizado na compreensão de como indivíduos de uma mesma espécie se ligam genealogicamente por meio de ancestrais comuns, porém de populações geograficamente distintas (Avise, 2000). Segundo Avise (2000), cerca de 70% dos estudos filogeográficos no século 20 envolveram análises de mtDNA. Essa elevação é creditada aos amplos benefícios que suas propriedades filogenéticas quase que exclusivas oferecem, como a herança uniparental (materna), apesar de algumas espécies animais transmitirem mtDNA através do espermatozoide (Anderson *et al.*, 1995), elevada taxa evolutiva (Triponez *et al.*, 2011), extensa variação intraespecífica, ausência de íntrons e recombinação genética intermolecular (Avise, 2000). Portanto, tão logo conhecermos o genoma e transcriptoma de *Astyanax* e outras espécies de peixes neotropicais, maiores serão as perspectivas e respostas sobre a função, organização e distribuição genômica, inclusive às relacionadas aos desafios sobre os cromossomos B.

1.4 Modelagem de nicho

Os últimos 800 mil anos do período Quaternário (um dos períodos da era Cenozóica) foram marcados por uma sucessão de ciclos glaciais (mais frios) com duração ~90-100 mil anos, e interglaciais (mais quentes) com duração ~10-12 mil anos. Atualmente, o planeta se encontra em uma fase interglacial, com início há cerca de 11.600 anos (Lino, 2009). Em uma escala geológica de tempo, mais especificamente ao longo do Quaternário, as secas tiveram dimensões catastróficas principalmente para a natureza, e essa exacerbação das secas milenares deu-se exatamente nos períodos de resfriamento global, ou seja, nas fases glaciais do Pleistoceno. Assim, há 10.000 anos iniciou-se o mais recente e marcante período interglacial já conhecido, que teve início conjuntamente à Transgressão marinha Flandriana (Marques e Oliveira, 2016), e obviamente, com pouca ou nenhuma influência antrópica. Nesse sentido, a partir dos anos 2.000 projeções de temperatura para os últimos 1.000 anos têm indicado que as mudanças da temperatura global não são exclusivamente ligadas à causas naturais (Wiens *et al.* 2009). Amostras retiradas de geleiras da Antártica revelaram que as concentrações atuais de carbono são as mais altas dos últimos 420.000 anos, e provavelmente dos últimos 20 milhões de anos (Wiens *et al.* 2009). Segundo Merengo (2006), o aumento de quase 0.6°C ao longo do século passado é baixo quando comparado às projeções para o próximo século, que poderá ficar entre 1.4-5.8°C já para o ano de 2.100.

Assim, além de medir os impactos ocasionados por mudanças climáticas, a modelagem de distribuição também tem sido amplamente utilizada como modelo para avaliar a distribuição potencial de espécies em análises biogeográficas (Siqueira e

Durigan, 2007), conservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (Engler *et al.* 2004), reintrodução de espécies (Hirzel *et al.* 2002), perda de biodiversidade (Polasky e Solo 2001), avaliação do potencial invasivo de espécies exóticas (Peterson *et al.* 2006), estudo das possíveis rotas de disseminação de doenças infecciosas (Costa *et al.* 2002; Levine *et al.* 2007), auxílio na determinação de áreas prioritárias para manejo e conservação (Chen, 2009), dentre outros.

Nesse sentido, os Biomas brasileiros abrigam uma porção significativa da biodiversidade mundial, constituindo importantes centros de biodiversidade com elevados níveis de riqueza e endemismo de espécies (Aleixo *et al.*, 2010). No entanto, essa biodiversidade vem sendo crescentemente ameaçada por atividades antrópicas, principalmente àquelas ligadas a conversão das paisagens naturais em áreas de produção agropecuária e ocupação imobiliária (Aleixo *et al.*, 2010). Além das alterações recentes nas paisagens naturais, mudanças climáticas em curso e previstas constituem um segundo fator de ameaça à biodiversidade nestes Biomas brasileiros (Aleixo *et al.*, 2010).

Modelos de distribuição espacial têm sido cada vez mais utilizados na projeção espaço-geográfica e padrões de ocorrência de espécies, principalmente na forma de mapas probabilísticos, e representam um método empírico eficiente para inferências estatísticas da distribuição de determinadas espécies sob a influência de diferentes processos químicos, físicos ou biológicos (Zimmermann *et al.*, 2010). Estas abordagens têm sido muito utilizadas para indivíduos terrestres, entretanto, nos últimos anos vêm ganhando mais espaço na área ictiológica, especialmente em bacias com amplas extensões onde há a disponibilidade de informações climáticas prévias (Schaefer e Arroyave, 2010).

A grosso modo, modelagem preditiva de distribuição de espécies, ou modelagem de nicho, consiste em um processamento computacional que combina registros de ocorrência de uma ou mais espécies com uma série de variáveis ambientais, construindo uma representação das condições requeridas pelas espécies (Anderson *et al.* 2003; Giannini *et al.*, 2012). Nesse sentido, alguns algoritmos têm sido aplicados na confecção de modelos representativos dessas condições, que quando projetados sobre um mapa, indicam áreas potenciais de ocorrência das espécies alvo (Giannini *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos associando genética à eventos climáticos ou geológicos ainda são raros e pouco expressivos em peixes, principalmente devido à dificuldade em se medir as condições e mutações ambientais, frequentemente associadas às ações antrópicas ou eventos físico/químico/biológicos naturais (Manel *et al.*, 2003).

De uma forma geral, a abordagem baseada na teoria de nicho usa a predição da distribuição com mapas associadas às coordenadas de ocorrência e fatores ambientais onde a espécie fora reportada (Patten e Auble, 1981), logo, as bases de dados existentes em sistemas de informação geográficas (SIG) são ferramentas úteis nestas avaliações (Dauwalter e Rahel, 2008), onde os modelos de distribuição podem contribuir para avaliações sobre o estado de conservação de regiões preferenciais de determinada espécie, barramentos, ou ainda características hidrográficas, que porventura, possam interferir no *habitat* de espécies ameaçadas ou de interesse em conservação ou produção (Dauwalter e Rahel, 2008). Em riachos que se alocam em biomas florestais, as condições de *habitat* e a história natural dos peixes que ali coexistem podem apresentar forte relação com a vegetação ripária, onde alterações na vegetação terrestre, mesmo que em menor escala, certamente poderiam afetar o *habitat* onde estas espécies aquáticas vivem (Vilella *et al.*, 2004).

Assim, ao unirmos processos evolutivos às características ambientais que poderiam afetá-los, colhemos informações evolutivas, ecológicas e biológicas importantes em um único experimento (Manel *et al.*, 2003). Portanto, a identificação de irregularidades ambientais envolvendo a área estudada torna-se uma etapa fundamental para o entendimento do trânsito de indivíduos em tempos históricos, ou ainda do fluxo gamético por meio de rupturas ecológicas ao longo de uma área geográfica, visando o esclarecimento do nível da conexão estrutural entre as diferentes circunstâncias ambientais envolvidas, dispondo para isso, de alguma informação genética da espécie (Holderegger e Wagner, 2006).

Como exemplo, em um estudo envolvendo a salamandra californiana *Ensatina eschscholtzii*, Kuchta *et al.* (2009) demonstraram claramente sua distribuição em anel ao longo de um cenário de expansão e interrupção demográficas perante uma paisagem geográfica restritiva à continuidade histórica do fluxo genético dentro da espécie. Na época de sua dispersão, havia um canal entre o Oceano Pacífico e o Vale Central Californiano, tornando esta região intransponível. Entretanto, os autores confirmaram que uma destas populações atravessou o canal, reencontrando sua população irmã ao sul de uma cadeia de montanhas, classificada atualmente como uma subespécie. Esse trabalho é hoje caracterizado como um modelo clássico de espécies em anel envolvendo populações descontinuas a nível genético e evolutivo. Em outro estudo envolvendo DNA mitocondrial, O'Loughlin *et al.* (2010) identificaram 74 unidades evolutivamente significativas de holoturódes (pepinos-do-mar), 12 em simpatria com morfo-espécies, indicando que possivelmente o isolamento geográfico, somado às pressões evolutivas em *habitats* antes considerados homogêneos, poderiam ter influenciado diretamente na evolução do grupo muito mais do que se pensava quando baseados apenas em informações morfológicas.

No Brasil, de forma similar, Carnaval *et al.* (2009) analisaram quatro espécies de anfíbios oriundas da Floresta Atlântica do Sudeste brasileiro, associando sua diversidade genética populacional a seus *habitats*. Segundo os autores, espécies do interior da floresta apresentam populações geneticamente mais diversificadas se comparadas às populações de borda de mata e áreas abertas, relacionando tal evento à fragmentação da floresta, uma vez que as populações de mata fechada não conseguem manter seu fluxo gênico, distanciando-se geneticamente das demais. Por outro lado, as de áreas abertas manteriam um nível migratório suficientemente necessário para sua manutenção genética. Trabalhos similares sugerem que um aumento na variação genética pode ser atribuído a eventos recentes de fragmentação e sua redistribuição ao longo de fragmentos de *habitats* (Driscoll e Hardy, 2005).

Somado a isso, considerando que devido às suas limitações morfo-fisiológicas peixes continentais são insuficientemente capazes de sobreviver fora de seu ambiente aquático, a existência de barreiras terrestres, por menor que seja, já seria suficiente para isolar populações dentro de suas drenagens (Vari, 1988), refletidas e reforçadas através de mudanças geomorfológicas e climáticas (Bermingham e Martin, 1998). Assim, a ictiofauna neotropical tanto em nível intra como interespecífico caracteriza-se como uma importante aliada para testar hipóteses biogeográficas históricas (Weitzman e Vari, 1990), e modelos de nicho de distribuição poderiam auxiliar de maneira muito positiva no mapeamento de distribuição potencial de espécies, (Soberón e Peterson, 2005).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Espécies de *Astyanax* são reportadas em praticamente todo território brasileiro, porém apenas uma pequena parcela das espécies apresentam cromossomos B. Cromossomos B são descritos apenas em 12 espécies, 10 nativas e duas de ambientes controlados. Assim, tendo-se em vista que muitos aspectos relacionados aos cromossomos B no gênero *Astyanax* ainda necessitam ser investigados, propomos os seguintes objetivos:

- 1) Associar a distribuição dos cromossomos B presentes no gênero *Astyanax* em diferentes cenários do passado, presente e futuro por meio de modelagem de nicho preferencial;
- 2) Analisar a distância genética entre populações de *A. bockmanni* (portadoras e não portadoras de cromossomos B) por meio de mtDNA, e associá-la à distância geográfica;
- 3) Caracterizar a diversidade genética de populações de *A. bockmanni* de diferentes regiões brasileiras, estabelecendo relações genéticas intra e interpopulacionais, utilizando os cromossomos B como parâmetro de comparação;
- 4) Contribuir com informações que levem a um melhor entendimento do papel desempenhado pelos cromossomos B entre as espécies e populações de *Astyanax*.

*MATERIAL E
METODOLOGIA*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Dados da espécie estudada

Visando mapear cromossomos B distribuídos entre espécies e populações do gênero *Astyanax*, utilizamos 184 exemplares da espécie *A. bockmanni*, dos quais 74 indivíduos correspondem a tecidos doados pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBB) – IBB - Unesp Botucatu exclusivamente para extração de DNA genômico total e, conseqüentemente, sua utilização para análises moleculares. Os 110 exemplares restantes foram amostrados, identificados, e posteriormente catalogados, encontrando-se depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes - LaGenPe, Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, Unesp/Bauru em álcool 70%. Todas as coletas foram realizadas sob autorização dos órgãos MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO – 18884-1, com registro no IBAMA nº 2567470. Somados, estes animais são provenientes de 16 populações, distribuídas ao longo das bacias hidrográficas brasileiras, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: relação das populações de *Astyanax bockmanni* amostradas para a realização de sequenciamento da região controle mtDNA e qPCR.

Espécie	N	Latitude/Longitude	Identificação da localidade	Drenagem	Município/Estado
<i>Astyanax bockmanni</i>	07	S 23°01'27.4" W 48°49'41.0"	Rio Novo	Rio Paraná	Avaré/SP
<i>A. bockmanni</i>	07	S 22°27'02.2" W 49°14'26.8"	Rio Água Doce	Ribeira de Iguape/Atlântico	Tapiraí/SP
<i>A. bockmanni</i>	06	S 23°56'17.9" W 50°43'44.5"	Córrego Lambari	Rio Paranapanema/Bacia do Prata	Sapopema/PR
<i>A. bockmanni</i>	07	S 23°45'01.2" W 46°09'52.9"	Rio Itatinga	Atlântico	Bertioga/SP
<i>A. bockmanni</i>	07	S 18°55'13.1" W 52°02'40.0"	Riacho sem nome	Rio Paraná	Aporé/GO
<i>A. bockmanni</i>	07	S 19°39'53.7" W 47°49'04.4"	afluente do Rio Uberaba	Rio Paraná	Uberaba/MG
<i>A. bockmanni</i>	07	S 23°11'28.0" W 50°56'45.0"	afluente do Rio Tibagi	Rio Tibagi/Paranapanema	Jataizinho/PR
<i>A. bockmanni</i>	08	S 22°53'54.0" W 48°23'20.0"	Rio Capivara	Rio Tietê	Botucatu/SP
<i>A. bockmanni</i>	11	S 22°59'24.0" W 48°25'36.0"	Ribeirão Água da Madalena	Rio Paranapanema	Botucatu/SP
<i>A. bockmanni</i>	06	S 18°43'14.6" W 44°20'47.3"	Córrego Amendoim	Rio das Velhas/Rio São Francisco	Curvelo/MG
<i>A. bockmanni</i>	23	S 22°45'3.11" W 49°22'80.17"	Rio Alambari	Rio Turvo/Paranapanema	Brasília Pta./Cabrália Pta./SP
<i>A. bockmanni</i>	29	S 22°6'40.92" W 49°16'5.81"	Rio Batalha	Rio Batalha/Tietê	Bauru/Piratinunga/SP
<i>A. bockmanni</i>	16	S 22°23'8.35" W 49°55'63"	Córrego Campo Novo	Rio Batalha/Rio Tietê	Agudos/Bauru/SP
<i>A. bockmanni</i>	14	S 22°27'6.12" W 48°53'44.34"	Córrego Barra Seca	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Bauru/Pederneiras/SP
<i>A. bockmanni</i>	16	S 22°34'55.1" W 49°24'14.4"	Córrego Jararaca	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Paulistânia/SP
<i>A. bockmanni</i>	13	S 22°34'26.6" W 49°24'15.4"	Riacho sem nome	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Espírito Sto do Turvo/SP

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estimulação de mitoses

Para a obtenção das preparações cromossômicas, foi adotada a técnica de estimulação de divisão celular, que consiste na inserção de uma solução de fermento biológico no dorso do animal, descrita por Oliveira *et al.* (1988) para peixes. O procedimento consiste em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) composta por 0,5g de fermento + 0,5g de açúcar + 7mL de água destilada;
- 2) incubar a solução em estufa a 37°C por aproximadamente de 30’;
- 3) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe, na proporção de 1mL para cada 100g de peso do animal. A dose administrada pode ser dividida em duas etapas, em um período de 48hs;
- 4) manter o animal em aquário bem aerado.

3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* seguiu o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1981), a qual, consiste na inibição da polimerização dos microtúbulos através da ação da colchicina, seguida de hipotonização das células em suspensão, e posterior fixação celular através de uma mistura de metanol/ácido acético.

O procedimento consiste em:

- 1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção aproximada de 1mL para cada 100g de peso do animal;
- 2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período aproximado de 50’;
- 3) sacrificar o animal, e retirar o rim anterior, posterior e por algumas ocasiões parte das brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7mL de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;

- 5) transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21’;
- 6) retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5’ à T°C ambiente;
- 7) adicionar cerca de 6mL de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10’;
- 8) retirar o sobrenadante, e ressuspender o material precipitado em 7mL de fixador; centrifugar por 7 min a 1000 rpm;
- 9) repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma boa lavagem e completa fixação uma das células em suspensão;
- 10) pingar o material em lâminas previamente tratadas em solução de HCL 10%;
- 11) deixar secar naturalmente em T°C ambiente.

3.2.3 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva, utilizamos o protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas adaptações, que consiste na ação sequencial ácido, base e solução salina, eliminando seletivamente partes do DNA cromossômico, permanecendo intactas as regiões de heterocromatina mais compactadas, conforme detalhada abaixo.

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 30’ em HCL 0,2N em T°C ambiente, e posteriormente lavar com água destilada, retirando todo o excesso de HCL;
- 2) passar por uma solução de BaOH₂ a 5%, alternando o tempo entre 12-30’’;

- 3) passar rapidamente em uma solução de HCl 1N a 60°C, e logo em seguida lavar novamente com água destilada;
- 4) incubar por 30' em 2xSSC (pH=6,8) a 60°C e lavar com água destilada;
- 5) corar por aproximadamente 30' com Giemsa 7,5% em tampão fosfato (pH=6,7).

3.2.4 Estudos cariotípicos

A partir dos dados obtidos, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares da espécie em questão. Nesse sentido, as imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus), com auxílio do Software CellSens Standart.

3.2.5 Extração do DNA genômico total

O DNA genômico total da espécie *Astyanax bockmanni* foi isolado com o 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 fotografadas com a 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 nos permitiu inferir que o DNA extraído era de boa qualidade. Após verificar sua integridade, as amostras foram

quantificadas em um quantificador de DNA (Qubit® 2.0 Fluorometer - Thermo Fisher Scientific) para medir a concentração de DNA contida em cada amostra.

Para a extração do DNA genômico total foram adotadas as seguintes etapas:

- 1) numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2) retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3) adicionar 600 µl de “*Nuclei Lysis Solution*”;
- 4) adicionar 5 µl de “*Proteinase K*” e vortexar;
- 5) levar ao banho-maria a 60°C por aproximadamente 2 horas; esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6) adicionar 2,5 µl de “*RNAse*” e colocar no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 7) adicionar 200 µl de “*Protein Precipitation Solution*” e misturar rapidamente no vórtex;
- 8) levar ao gelo por 5 minutos;
- 9) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10) remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11) inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA se tornem visíveis;
- 12) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13) adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;

- 14) centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 15) descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 16) adicionar aproximadamente 30 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65°C ou 24 horas a 4°C.

3.2.6 Amplificação do mtDNA D-loop

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação do mtDNA D-loop com os *primers* H16498 5'-CACCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M 5'-ACATGAATTGGAGGTATAACCAGT-3' (Prioli *et al.*, 2002). Os padrões utilizados foram: Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 plus 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U *Taq*-polymerase (Applied Biosystems), 15 ng de DNA total e água para completar a um volume final de 12 µL. Os produtos amplificados foram verificados em eletroforese de gel de agarose 1,5%, corado com SYBR® Safe DNA (0,015 µL/mL), visualizadas em um transluminador sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera Olympus C-5060.

Para a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi adotado o seguinte programa:

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) 94°C - 2' (desnaturação inicial) | |
| b) 94°C - 30'' (desnaturação) |  35 ciclos |
| c) 56°C - 30'' (anelamento) | |
| d) 72°C - 7' (extensão) | |
| e) 12°C - 10' (manutenção) | |

3.2.6.1 Purificação do produto PCR D-loop mtDNA com a enzima Exo-SAP

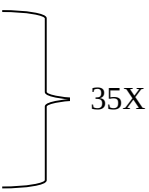
As amostras amplificadas pela reação de PCR foram purificados por meio da enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation). Para isto, 5 µL do produto amplificados foram adicionados em um microtubo (0,2 mL) e posteriormente adicionado 2,0 µL da solução de purificação (0,13 µL de ExoSap + 1,87µL de água ultrapura).

3.2.6.2 Preparação da placa de sequenciamento

Para a preparação da placa de sequenciamento foi utilizado o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems), nas seguintes concentrações:

- a) 1,0 µL do DNA amplificado (concentração de aproximadamente 40 ng/mL);
- b) 0,35 µL de primer (Forward ou Reverse, 10 uM);
- c) 0,7 µL de BigDye;
- d) 1,05 µL de Tampão 5X para sequenciamento;
- e) 3,9 µL de H₂O miliQ.

Após a mistura dos reagentes com os DNAs amplificados, o material foi levado à um termociclador, conforme o programa abaixo:

- a) 96°C - 2' (desnaturação inicial)
 - b) 96°C - 30'' (desnaturação)
 - c) 50°C - 15'' (anelamento)
 - d) 60°C - 4' (extensão)
 - e) 12°C (manutenção)
- 
- The diagram shows a right-facing curly bracket grouping items b, c, and d. To the right of the bracket is the label '35X'.

3.2.6.3 Purificação das amostras utilizando EDTA/Acetato de sódio/Etanol

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

- a) primeiramente foi adicionado 0,7µL de EDTA (125mM) e 0,7µL de acetato de sódio (3M) a cada amostra;
- b) adicionar 17,5µL de etanol 100% para posterior incubação por 15' a T°C ambiente;
- c) em seguida centrifugou-se por 75' a 3.500 rpm à 25°C, descartando o sobrenadante posteriormente;
- d) novamente as amostras foram colocadas na centrifuga para um spin invertido por 1' a 1250 rpm;
- e) adicionou-se 24,5µL de etanol 70% gelado e centrifugou-se por 18' a 3.500 rpm à 25°C, sendo retirado o sobrenadante posteriormente;
- f) foi realizado um novo spin invertido na centrifuga por 2' a 1250 rpm;
- g) por último as amostras foram colocadas no termociclador por 8' a 96°C com a tampa do termociclador aberta (para a completa evaporação do etanol);
- h) as placas foram mantidas em geladeira envoltas em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.2.6.4 Sequenciamento do mtDNA

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5,' e submetidas a um sequenciador automático ABI 3730 XL Analyzer (Applied

Biosystems, Foster City, California), lotado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO - UNESP Jaboticabal/SP, conforme recomendações do fabricante.

3.2.7 Análises das sequências de mtDNA D-loop obtidas

Após a realização do sequenciamento, os eletroferogramas das sequências do fragmento de DNA mitocondrial foram visualizados através do programa Geneious v.4.8.5 (Kearse *et al.*, 2012). A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou decorrentes da técnica do sequenciamento utilizada. A edição e o alinhamento das sequências também foram realizados no programa Geneious v.4.8.5, com base em *Muscle Alignment*. Posteriormente, a identidade das sequências foi confirmada no algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando-se como referência o genoma mitocondrial completo de *A. paranae* (Silva *et al.*, 2016b), além de sequências parciais mtDNA D-loop de *A. bifasciatus* (Tschá *et al.*, 2017) e *A. altiparanae* (Prioli *et al.*, 2002). Em seguida, as sequências foram submetidas ao Teste de Saturação de Xia (Xia *et al.*, 2003; Xia e Lemey, 2009) no programa DAMBE v.6 (Xia, 2017), onde foi efetuado uma busca de mutações que poderiam ter ocorrido em um mesmo sítio ao longo do tempo.

A composição nucleotídica, os sítios polimórficos e diversidades haplotípica (*h*) e nucleotídica (π) foram avaliados nos programas Geneious v.4.8.5 e DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) (Rozas *et al.*, 2003) como complemento um do outro, e a

diversidade haplotípica calculada no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005). Para quantificar a diferenciação genética entre as populações de *A. bockmanni* utilizamos o teste estatístico F (Wright, 1949; 1965), onde valores F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15 estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25 alta estruturação; e valores acima de 0,25 forte estruturação genética. Em seguida, foi verificada a heterogeneidade genética entre os haplótipos D-loop mtDNA através da variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) por meio do programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 associado à estatística F de Wright (1949, 1965). Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) também foram feitos utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3. Os arquivos de saída do tipo texto gerados pelo programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 foram observados no programa Notepad++ v.7.5.3 (Shum, 2013). Já os gráficos gerados pelo programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 foram observados no programa GIMP v.2.9.4 (disponível em <https://www.gimp.org/downloads>).

As redes haplotípicas foram construídas no programa popART (Leigh e Bryant, 2015) e os dendogramas gerados no programa FigTree v.1.4.3 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>), sendo considerado o método do tipo *Median-joining*. O teste de isolamento por distância foi conduzido utilizando $F_{st}/(1 - F_{st})$ (Rousset, 1997) com a distância geográfica pelo teste de Mantel (Mantel, 1967) no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 associado ao programa R (disponível em <https://www.r-project.org>), considerando-se 10.100 permutações.

Todas as matrizes de sequência utilizadas para as diferentes análises foram estruturadas e editadas no programa MEGA v.7, e os arquivos de entrada para os demais programas foram configurados no programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009).

3.2.8 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A sigla qPCR significa PCR quantitativa em Tempo Real, traduzido do inglês *Real Time quantitative PCR* ou ainda RT-qPCR. Isto porque a metodologia permite realizar a quantificação do alvo durante o processo de amplificação do DNA (Cavalcanti e Miranda, 2008). Esta metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizadas 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 devido à adição de sondas fluorescentes às reações de PCR. Assim, à medida em que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente, permitindo determinar com precisão a quantidade de DNA-alvo presente na amostra original (Martins *et al.*, 2016). Logo, a qPCR pode ser utilizada para se avaliar a presença de um patógeno em uma amostra, podendo ser um teste qualitativo ou quantitativo (Martins *et al.*, 2016).

Neste trabalho foi quantificada a expressão da proteína NUSAP em populações de *A. bockmanni*, que tem como função se agrupar e estabilizar microtúbulos por similaridade, promovendo a organização dos microtúbulos do fuso mitótico à sua volta (Raemaekers *et al.*, 2003). Para a efetivação do experimento de quantificação da expressão, 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, que detecta a fluorescência emitida na medida em que a dupla fita de

DNA é formada devido a concentração do corante entre as novas cadeias de DNA que são geradas.

O marcador B_M utilizado foi obtido com base no genoma de *A. paranae*, em parceria com o Laboratório de Biologia de Peixes, IB Unesp Botucatu. Inicialmente foi sequenciado o gDNA de um indivíduo que 0B e um +B por Illumina Hiseq2000, com coberturas de 18,4x e 7,5x, respectivamente. Em seguida, foi sequenciado o RNA total de gônadas e músculos de três fêmeas de 0B e três de 1B. Com estas 12 bibliotecas de RNA-seq foi construído um transcriptoma *de novo* usando Trinity. Assim, com base nas regiões CDS deste transcriptoma foi mapeado o gDNA e RNA de indivíduos 0B e +B por meio do software SSAHA2, e em seguida foram selecionados os CDSs sobre-representados no genoma +B. Além disso, comparamos a cobertura desses CDS em toda a extensão 0B e +B em bibliotecas genômicas e transcriptômicas para verificar se os genes do cromossomo B estavam completos, bem como sua presença nas bibliotecas de RNA, sendo validados via qPCR usando gDNA de indivíduos de 0B, 1B e 2B e cDNA de indivíduos de 0B e 1B. Os genes foram amplificados a partir do DNA de um cromossomo B_M microdissectado de *A. paranae*, o que permitiu confirmar a presença de pelo menos seis genes codificadores de proteínas no cromossomo B desta espécie (NUSAP, MDM2, MOT1 E MSH4, CCPG1, SBNO2), com o gene NUSAP se mostrando muito sobre-expresso em relação aos indivíduos 0B.

Após esta etapa, foi feita a quantificação do gene NUSAP em indivíduos reconhecidamente portadores de cromossomos B_M por meio de técnicas citogenéticas, B_m e B_a da espécie *A. bockmanni*, o qual se mostrou sobre-expresso apenas em indivíduos portadores do cromossomo B_M. Em seguida, o marcador foi aplicado em todas as populações de *A. bockmanni* (tabela 2) com desconhecimento de seu conteúdo

cariotípico, a fim de verificarmos uma possível ocorrência de cromossomos B em seu genoma.

3.2.9 Modelagem do nicho preferencial

Com o intuito de inferir relações de padrões biogeográficos na ocorrência e/ou ausência de cromossomos B no gênero *Astyanax*, inicialmente foi realizado um levantamento de todos os registros de ocorrência de cromossomos B entre as espécies do grupo, os quais corresponderam a oito espécies. Para as inferências biogeográficas e climáticas, foram ignoradas as espécies *A. mexicanus* e *A. jordani*, pois, apesar de ser reportado a presença de cromossomos B em seu genoma, ambas são produto de aquarismo. Adicionalmente, não foram levados em consideração o tamanho ou morfotipos dos cromossomos B reportados, apenas sua localização geográfica (conforme figura 1). Foram ignorados os registros de espécies ou populações que não fossem orirundas de ambientes naturais, uma vez que ambientes controlados não oferecem as informações necessárias para inferências climáticas em tempos distintos (passado e futuro).

Após o levantamento de todas as espécies de *Astyanax* portadoras de supranumerários, um novo levantamento fora feito, dessa vez, levando-se em consideração todas as populações naturais das oito espécies do grupo *Astyanax* com e sem o cromossomo B em seu genoma. Para tal, partimos do princípio de que se uma população do grupo tivesse registros de ocorrência de cromossomos B, todas as demais populações da espécie em questão, com ou sem supranumerários deveriam ser computadas para calibração e análises estatísticas exigentes.

Dessa forma, foram realizados cinco métodos de modelagem para inferir os padrões de distribuição prevista da ocorrência de cromossomos B em *Astyanax*: *boosted regression trees* (BRT), *generalized linear model* (GLM), *generalized additive model* (GAM), *random forests* (RF) e *support vector machines* (SVM). Tais métodos foram integralmente programados e executados no programa RStudio (extensão do programa R), e são caracterizados por produzirem desempenhos extremamente satisfatórios (Elith *et al.*, 2006; Vasconcelos, 2014; Naimi e Araújo, 2016). Para cada um dos modelos executados, 80% do conjunto total dos pontos de ocorrência (com e sem cromossomos B) foram usados para a calibração do modelo a ser utilizado, e os demais 20% restantes, utilizados para avaliar e validar o mesmo modelo. Sendo assim, este procedimento foi replicado 10X, utilizando o procedimento de sub-amostragem aleatória sem reposição (Naimi e Araújo, 2016). Após, os modelos foram avaliados pela curva característica de operação do receptor (ROC curve), que consiste em uma estatística independente do limiar, cuja área sob a curva (em inglês, AUC) varia de 0 a 1, onde 0 indica ausência; valores iguais a 0,5 representam modelos semelhantes a uma predição aleatória; e valores iguais a 1,0 indicam elevado poder preditivo (Elith e Burgman, 2002). Uma segunda métrica utilizada foi a *true skill statistic* (TSS), dependente do limiar, e que considere igualmente erros de comissão e omissão, variando de -1 (modelos semelhantes a uma predição aleatória) a 1 (modelos com perfeito ajuste estatístico).

Para a seleção das variáveis climáticas preditoras utilizadas durante a construção dos modelos, foram consideradas todas as variáveis climáticas disponíveis na plataforma WorldClim a uma resolução aproximada de 10x10 Km (http://www.worldclim.org/cmip5_5m) (Hijmans *et al.*, 2005). Posteriormente, para evitar a seleção de variáveis colineares e redundantes, estas foram submetidas à análise do fator de inflação de variância (Naimi e Araújo, 2016), sendo selecionadas as

variáveis médias de temperatura anual, sazonalidade da temperatura, amplitude térmica anual, precipitação anual, sazonalidade da precipitação e precipitação no trimestre mais quente.

Para projetar o nicho ecológico potencial das espécies em cenários do passado (Mid-Holoceno – há 6.000 e Last Glacial Maximum – há 22.000) e futuro (2060), usamos dois caminhos de concentração representativos de cenários de emissão de CO₂ (CCR 2.6 e CCR 8.5), considerados de três modelos de circulação global (Atmosphere-Ocean Global Circulation Models: AOGCMs) do painel intergovernamental de mudanças climáticas (IPCC, 5ª avaliação): Community Climate System Model (CCSM4); New Global Climate Model of the Meteorological Research Institute (MRI-CGCM3) e Institute Pierre Simon Laplace (IPSL-CM5A-LR).

Para considerar as diferenças inerentes de cada algoritmo de modelagem e as diferentes bases de dados de clima utilizadas, geramos uma previsão consensual para as populações portadoras e não portadoras de cromossomos B das oito espécies foco em cada período de tempo analisado (presente, Mid-Holoceno e Last Glacial Maximum). O mapa consensual foi gerado pelo cálculo da média da adequabilidade climática de cada grid de 10 x 10 Km dos 50 modelos finais projetados para o clima atual (5 algoritmos x 10 replicações) e 300 modelos finais para ambos cenários de clima passado (5 algoritmos x 10 replicações x 3 modelos de circulação global x 2 cenários de emissão de CO₂) e futuro. As projeções consensuais para cada período foram sobrepostas entre elas, sendo que os pontos de ocorrência das populações portadoras de cromossomo B foram plotados nestes mapas para checar se estes pontos estão localizados na área de sobreposição das quatro predições, área esta que indica localidades climaticamente estáveis onde os cromossomos B, presumidamente, tiveram mais chances de persistirem e se manterem ao longo do tempo.

Da mesma forma, com base em dados atuais de taxa de desmatamento, poluição, agropecuária e agroindustrial, consumo de água, aumento populacional, produção de lixo, dentre outros, foi modelado um mapa consensual para prever os padrões climáticos que permitiriam ocorrências de populações com cromossomos B no ano de 2060. Uma frente levou em consideração a estatística do crescimento destes índices de acordo com a demanda populacional. Já a outra frente levou em consideração que os países reduzam as taxas acima mencionadas, principalmente às com maior impacto ambiental, ou seja, seguindo-se todos os tratados ambientais propostos. Assim, foram gerados mapas consenso estatisticamente aceitos que levaram em consideração as duas frentes.

3.2.10 Quantum GIS copiapó

Com o processamento das informações e geração dos mapas binários de predição de ocorrência das espécies de *Astyanax* com base em suas coordenadas no programa RStudio (uma extensão do Programa R), estes mapas foram então plotados no programa Quantum GIS 1.6.0 copiapó, utilizando imagens de satélite disponíveis na base de dados da National Aeronautics and Space Administration - NASA (<https://www.nasa.gov>) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (<https://www.embrapa.br/monitoramento-por-satelite>). Dessa forma, pudemos criar e editar mapas distintos envolvendo populações portadoras e não portadoras de cromossomos B, bem como um enfoque maior nas populações com e sem cromossomos B de *A. bockmanni*. Estes mapas foram criados em todos os cenários preditivos para os períodos presente, passado (há 6.000 -Mid-Holoceno e 22.000 anos atrás - Last Glacial Maximum), e futuro (2060) e posteriormente editados no programa Adobe Photoshop CS5.

*RESULTADOS E
DISCUSSÃO*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações inseridas no tópico resultados e discussão serão apresentadas na forma de capítulos, caracterizados como artigos científicos.

Capítulo 1: Diversidade de Cromossomos B no gênero *Astyanax*

Capítulo 2: Modelagem de nicho preferencial entre espécies e populações do gênero *Astyanax*: ênfase em cromossomos B

Capítulo 3: Análises populacionais de *Astyanax bockmanni* a partir do mtDNA D-loop

CAPÍTULO 1

Diversidade de Cromossomos B no gênero

Astyanax

CAPÍTULO 1

Diversidade de Cromossomos B no gênero *Astyanax*

Resumo

O gênero *Astyanax* é composto por aproximadamente 147 espécies, abundantes na maioria das bacias hidrográficas brasileiras. Nesse sentido, estudos têm revelado a presença de cromossomos B em diversas populações de pelo menos 12 espécies, os quais apresentam número, forma e tamanho distintos. Cromossomos B são definidos como elementos adicionais, que mantêm um mecanismo de evolução, transmissão e manutenção particulares, e não seguem as leis de transmissão mendeliana. Nesse sentido, *Astyanax* se apresenta como um excelente modelo de estudos evolutivos, manutenção e comportamento de cromossomos B em peixes, entretanto, informações relacionadas à esta classe cromossômica em *Astyanax* muitas vezes encontram-se isoladas ou desconectadas. Somado a isso, ao longo da última década, diversas sondas B-específicas foram isoladas e criadas a partir de cromossomos B inteiros de peixes, que aliadas ao sequenciamento genômico têm permitido análises bem sucedidas e resultados detalhados sobre sua estrutura molecular. No entanto, para o grupo *Astyanax* não há um levantamento bibliográfico efetivo desta classe cromossômica relacionando as espécies ou ainda as populações portadoras, tampouco sua distribuição geográfica, morfologias, padrão heterocromático, comportamento mitótico, mapeamento gênico, presença de genes funcionais, dentre outros. Assim, esta revisão compila informações voltadas ao conhecimento dos supranumerários em peixes neotropicais, mais especificamente os que compreendem o gênero *Astyanax*.

Aspectos gerais sobre o gênero Astyanax

Os Characiformes são constituídos por 18 famílias, 270 gêneros, e aproximadamente 1674 espécies (Nelson 2006), com a família Characidae considerada uma das mais complexas e numerosas, com mais de 1100 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2017). O gênero *Astyanax* é reportado como o mais diversificado dentre os Characidae neotropicais (Lucena *et al.*, 2013), somando 154 espécies ((Eschmeyer, 2017). Espécies que compõe este gênero são abundantes ao longo da maioria das cabeceiras de pequenos rios, riachos e córregos das bacias hidrográficas brasileiras (Garutti e Britski, 2000; Lima *et al.*, 2003; Vari e Castro, 2007), distribuindo-se desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul Argentino (Bertaco *et al.*, 2010), expondo acentuada diversidade quanto ao número diploide, como $2n=36$ cromossomos em *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983) a $2n=50$ cromossomos em *A. bockmanni* (Kavalco *et al.*, 2009). Além disso, pode-se notar uma variação quanto ao padrão cariotípico, cromossomos supranumerários, triploidia natural, polimorfismos de heterocromatina, NORs, genes ribossomais, dentre outras (Morelli *et al.*, 1983; Fauaz *et al.*, 1994; Mestriner *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2008; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Daniel *et al.*, 2012, 2015; Silva *et al.*, 2013, 2016). Essas variações podem ser relacionadas à altitude, diferenciação sexual ou até mesmo poluição ambiental (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Néo *et al.*, 2000).

Nesse sentido, com o advento da citogenética molecular em meados da década de 80, informações mais detalhadas acerca de uma infinidade de informações pouco relacionadas entre as espécies de *Astyanax* começaram a emergir, principalmente relacionadas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Meltzer *et al.*, 1992). Dessa forma, a associação entre sondas de diferentes segmentos de DNA passou a permitir

estudos mais robustos relacionados à composição, evolução e estrutura do material genético cromossômico em peixes (Hashimoto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013, 2016; Daniel *et al.*, 2015b). Foi justamente com esse impulso informativo que o termo “complexo de espécie” pôde ser proposto em pelo menos cinco grandes grupos no gênero *Astyanax*: *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2004), *A. fasciatus* (Artoni *et al.*, 2006), *A. bimaculatus* (Garutti e Langeani, 2009) e *A. hastatus* (Kavalco *et al.*, 2009).

Complexos de espécies são grupos de espécies estreitamente relacionadas, de difícil diferenciação por caracteres morfológicos, ou seja, a existência de complexos de espécies é caracterizada quando duas ou mais espécies são classificadas sob o nome de apenas uma (Bickford *et al.*, 2007). Este termo foi mencionado pela primeira vez na espécie *A. scabripinnis* por Moreira-Filho e Bertollo (1991), baseando-se em análises citogenéticas e morfométricas de distintas populações de *A. scabripinnis*, onde as características morfológicas dos exemplares eram semelhantes, entretanto a presença de diversos citótipos se tornou frequente entre as diferentes populações estudadas. A associação destas características citogenéticas ao isolamento geográfico das populações estudadas levaram os autores a proporem a existência de um “complexo de espécies”, hoje popularmente conhecido como “complexo *scabripinnis*”. Paralelamente, Maistro *et al.* (1992) observaram resultados semelhantes entre populações de *A. scabripinnis paranae*, suportando e fortalecendo a hipótese anteriormente sugerida por Moreira-Filho e Bertollo (1991) de que o isolamento entre populações de uma mesma espécie acarreta rearranjos cromossômicos de forma individualizada em cada uma das populações. Adicionalmente, estudos com diversas espécies do gênero *Astyanax* têm demonstrado dinamismos populacionais particulares, que podem levar à formação de populações geneticamente muito variáveis uma das outras (Vari e Castro, 2007), e novos registros

de complexos ou populações de espécies já contidas nos complexos, tornam-se promissores na medida em que avançamos no conhecimento do gênero. Esporadicamente, casos de triploidia natural foram reportados em populações compreendidas pelo “complexo *scabripinnis*” (Maistro *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 2012) e “complexo *fasciatus*” (Peres *et al.*, 2009).

Portanto, considerando a intensa variabilidade cariotípica em representantes do gênero *Astyanax* (Hashimoto *et al.*, 2011), ampla distribuição geográfica (Zanata e Camelier, 2009), elevada plasticidade fenotípica, grande capacidade em se adaptar aos mais diversos ambientes (Dowling *et al.*, 2002), rápida especiação ecológica e diferenciação morfológica (Reeves e Bermingham, 2006), estudos citogenéticos e citogenético-moleculares representaram e ainda vêm representando excelentes ferramentas na busca de um melhor conhecimento dos representantes deste grupo de peixes.

Cromossomos B

Cromossomos B (ou supranumerários) são definidos por Douglas e Birchler (2017) como elementos adicionais ao conjunto de cromossomos normais, os quais, não seguem as leis de herança mendeliana, e têm sido amplamente descritos em diversas espécies de fungos, plantas e animais, porém, ainda são considerados um mistério evolutivo desde a sua descoberta há mais de século. Em uma determinada população, podem ser encontrados apenas em alguns indivíduos (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2015), e podem variar em número e morfologia entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre populações (Carvalho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Penitente *et al.*, 2016; Utsunomia *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2017).

Inicialmente, e até há pouco tempo, cromossomos B eram considerados elementos não funcionais e sem portar genes essenciais, uma vez que são dispensáveis, não conferindo, aparentemente, qualquer vantagem aos organismos que os mantêm (Houben *et al.*, 2013). Assim, são pensados como elementos parasíticos ou egoístas, persistindo nas populações (Manrique-Poyato *et al.*, 2013) e fazendo uso da maquinaria celular necessária para sua manutenção, transmissão e fixação (Cabrero *et al.*, 2013). Quando presentes em número reduzido, geralmente têm pouco ou nenhum impacto sobre os portadores, porém, quando presente em escalas maiores podem causar diferenças fenotípicas consideráveis, podendo inclusive reduzir a fertilidade (Jones e Rees, 1982; Banaei-Moghaddam *et al.*, 2015). Atualmente, 34 cromossomos B é o maior número de supranumerários reportados em um único indivíduo, superando inclusive seu número de cromossomos autossomos. Neste caso o representante era uma espécie de milho (Jones e Rees, 1982).

Quanto à origem dos cromossomos B nas mais diversas formas e tamanhos dentre as espécies, muitas hipóteses são levantadas. Nesse sentido, Volobujev (1981) propõem duas hipóteses gerais bem aceitas academicamente: *a*) cromossomos B seriam produtos de rearranjos estruturais, frutos evolutivos de um ancestral comum; *b*) supranumerários se originariam a partir da não disjunção cromossômica de cromossomos autossomos, seguido de inativação genética. Há ainda uma outra hipótese proposta por Foresti (1998), a qual sugere que estes segmentos genômicos poderiam se originar a partir de processos de construção e quebras de segmentos genômicos em processos fisiológicos celulares normais, denominado *de novo*. Em suma, cromossomos B têm despertado cada vez mais interesse nas mais variadas áreas de conhecimento visando informações que permitam entender um pouco mais dos mecanismos envolvidos em sua genética particular.

Cromossomos supranumerários em *Astyanax*: origem, manutenção e organização gênica

Em peixes, cromossomos B são reportados em 113 espécies (<http://www.bchrom.csic.es>) (D'Ambrosio *et al.*, 2017), e reportados pela primeira vez no gênero *Astyanax* por Salvador e Moreira-Filho (1992), dirigidos à presença de um cromossomo adicional presente na espécie *A. scabripinnis*. Hoje, pesquisas indicam a ocorrência destes elementos adicionais em pelo menos outras 11 espécies: *A. scabripinnis paranae* (Maistro *et al.*, 1992), *A. fasciatus* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. schubart* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. sp. B* (Fazoli *et al.*, 2003), *A. mexicanus* (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007), *A. altiparanae* (Hashimoto *et al.*, 2008), *A. eigenmanniorum* (Torres-Mariano e Morelli, 2008), *A. bockmanni* (Hashimoto *et al.*, 2011), *A. goyacensis* (Santos *et al.*, 2013), *A. paranae* (Abelini *et al.*, 2014) e *A. jordani* (Silva *et al.*, 2015), dispostos e distribuídos nas mais variadas formas, tamanhos e populações, conforme disposto na tabela 1.

Tabela 1: relação de todas as populações e variantes de cromossomos B reportadas no gênero *Astyanax*.

Espécie	N/tamanho B	Município/Estado	Referência
<i>Astyanax altiparanae</i>	1 B _a	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2008
<i>A. altiparanae</i>	1B _a	Bauru, SP	atual trabalho
<i>Astyanax bockmanni</i>	1B _M	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2016
<i>A. bockmanni</i>	1 B _a	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011
<i>A. bockmanni</i>	1-2 B _a	Paulistânia, SP	atual trabalho
<i>A. bockmanni</i>	1 B _M / 1 B _m / 2 B _a	Bauru, SP	Daniel <i>et al.</i> , 2012
<i>Astyanax goyacensis</i>	1-9 B _m / B _a	Monte do Carmo, TO	Santos <i>et al.</i> , 2013
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	1-2 B _M	Uberlândia, MG	Torres-Mariano e Morelli, 2008
<i>Astyanax fasciatus</i>	1 B _M / 1 B _{SM} / 1B _{ST}	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Ferreira-Neto <i>et al.</i> , 2012
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Mogi Guaçu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. fasciatus</i>	1-2 B _A	Bauru, SP	atual trabalho
<i>A. fasciatus</i>	1B _A	Bauru, SP	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011
<i>A. fasciatus</i>	1 B _M	Três Marias, MG	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 2001

<i>A. fasciatus</i>	1-2 B _{ST}	Bauru, SP	atual trabalho
<i>Astyanax paranae</i>	1 B _M / 1 B _{SM}	Botucatu, SP	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>A. paranae</i>	1 B _M	Maringá, PR	Abelini <i>et al.</i> , 2014
<i>Astyanax scabripinnis</i>	1 B _M	Maringá, PR	Abelini <i>et al.</i> , 2014
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _{SM}	Itirapina, SP	Souza <i>et al.</i> , 1995
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Castro <i>et al.</i> , 2014
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M / 1 B _{SM} / 1 B _{ST} / 1 B _A	Maringá, PR	Fernandes e Martins-Santos, 2005
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _M	Campos do Jordão, SP	Salvador e Moreira-Filho, 1992
<i>A. scabripinnis</i>	2 B _M / 1 B _{SM}	Campos do Jordão, SP	Néo <i>et al.</i> , 2000
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Campos do Jordão, SP	Mestriner <i>et al.</i> , 2000
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M / 1-2 B _{SM}	Campos do Jordão, SP	Ferro <i>et al.</i> , 2003
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _m	Paranavaí, PR	Alves e Martins-Santos, 2002
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Castro <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Maringá, PR	Castro <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Pindamonhangaba, SP	Barbosa <i>et al.</i> , 2015
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _M	Botucatu, SP	Machado <i>et al.</i> , 2012
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Maistro <i>et al.</i> , 2001
<i>A. scabripinnis</i>	1-2 B _a	Cerqueira César, SP	Mizoguchi e Martins-Santos, 1997
<i>A. scabripinnis</i>	1 B _M	Floresta, PR	Mizoguchi e Martins-Santos, 1997
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Porto-Foresti <i>et al.</i> , 1997
<i>A. scabripinnis paranae</i>	1 B _M	Botucatu, SP	Maistro <i>et al.</i> , 1992
<i>Astyanax schubarti</i>	1 B _M	Missiones, Ar	Moreira-Filho <i>et al.</i> , 2000
<i>Astyanax</i> sp. B	1 B _M / 1 B _{SM} / 1 B _a	Capitão Leônidas Marques, PR	Fazoli <i>et al.</i> , 2003
<i>Astyanax jordani</i>	1 B _m	aquariofilia	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Astyanax mexicanus</i>	1 B _a	aquariofilia	Kavalco e Almeida-Toledo, 2007

Para as espécies do gênero *Astyanax*, as expressões mais reportadas e direcionadas a uma determinada forma e tamanho de cromossomos B são as propostas por Moreira-Filho *et al.* (2004), utilizadas pela primeira vez para ilustrar os diferentes morfotipos de supranumerários presentes em *A. scabripinnis*: B_M, B_m, B_{SM}. B_M corresponde a um cromossomo B metacêntrico grande; B_m a um B metacêntrico pequeno, e assim sucessivamente, com a primeira letra sempre referindo-se a um cromossomo B, e a segunda discriminando a sua morfologia. Se a segunda letra for maiúscula, refere-se a um supranumerário grande (denominados macrocromossomos) ou médio (denominados cromossomos B médios). Se a segunda letra for minúscula,

trata-se de um cromossomo B pequeno, chamados de microcromossomos. Esta conotação à supranumerários tem sido adotada por diversos autores.

Nesse sentido dentre os vários supranumerários reportados para *A. scabripinnis*, a variante B_M é a que apresenta maior ocorrência em populações naturais, provavelmente, esta variante corresponda a um morfotipo de cromossomo B ancestral no gênero, pois também é observado em diversas outras espécies e populações do grupo (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Além disso, algumas evidências sugerem que este B_M trata-se de um isocromossomo, inclusive com homologia funcional e estrutural entre seus dois braços, hipótese inicialmente levantada por Vicente *et al.* (1996) e corroborada por mais tarde por Vicari *et al.* (2011). As demais variantes derivariam provavelmente de rearranjos estruturais do cromossomo B_M (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Fernandes e Martins-Santos, 2005), onde em sua maioria apresentam-se totalmente heterocromáticos (Néo *et al.*, 2000b; Ferro *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2015).

Cromossomos B restritos a um determinado sexo também são relatados em populações de *A. scabripinnis*, tanto macrocromossomos B restritos apenas às fêmeas (Maistro *et al.*, 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997), quanto microcromossomos B restritos a machos (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993), ou ainda associados à distorção na proporção sexual em algumas populações (Vicente *et al.*, 1996; Porto-Foresti *et al.*, 1997) (a relação das formas e tamanho dos cromossomos B descritos no gênero *Astyanax* encontra-se representada na figura 1).

	<i>Astyanax bockmanni</i> - B _M /B _m (macro/micro) <i>A. schubarti</i> - B _M (macro) <i>A. fasciatus</i> - B _M (macro) <i>A. paranae</i> - B _M (macro) <i>A. scabripinnis</i> - B _M /B _m (macro/médio/micro) <i>A. eigenmanniorum</i> - B _M (macro) <i>A. jordani</i> - B _m (micro) <i>A. sp. B</i> - B _M (macro)
	<i>A. fasciatus</i> - B _{sm} (médio) <i>A. paranae</i> - B _{SM} (macro) <i>A. scabripinnis</i> - B _{SM} /B _{sm} (macro/médio) <i>A. sp. B</i> - B _{SM} (macro)
	<i>A. fasciatus</i> - B _{st} (médio) <i>A. scabripinnis</i> - B _{ST} (macro)
	<i>A. bockmanni</i> - B _a (micro) <i>A. altiparanae</i> - B _a (micro) <i>A. goyacensis</i> - B _A /B _a (macro/médio/micro) <i>A. fasciatus</i> - B _a (médio) <i>A. scabripinnis</i> - B _A /B _a (macro/micro) <i>A. mexicanus</i> - B _a (micro) <i>A. sp. B</i> - B _a (acro)

Figura 1: morfologias e tamanho de cromossomos B reportados entre as espécies do gênero *Astyanax*.

De forma curiosa, apesar de muitas espécies de *Astyanax* possuírem cromossomos B raramente há registros de dois cromossomo B simultâneos em seus genomas, e para algumas destas espécies, apenas uma população apresenta tais elementos (Fazoli *et al.*, 2003). Nesse sentido, a partir de caracterização citogenética em *A. goyacensis*, Santos *et al.* (2013) observaram entre 1 e 9 microcromossomos B (acrocentricos e metacentricos), os quais apresentavam polimorfismos intra e interindividuais, bem como um padrão completamente heterocromático para a maioria destes elementos. Além disso, os autores isolaram e produziram uma sonda B-específica de um dos seus nove microcromossomos B, observando associações desta sonda em oito dos nove micros-B, além de marcações consistentes em alguns cromossomos A, sugerindo, portanto, que os cromossomos B desta espécie possam ter se originado partir

de fragmentos de cromossomos padrão, onde dois pares acrocêntricos são os candidatos mais parcimoniosos. Esta é a primeira e única menção de cromossomos B nesta espécie, e ainda o maior registro em número, de cromossomos B dentre todas as espécies deste grupo.

Registros únicos de supranumerários também são aplicados às espécies *A. sp. B*: entre 1 e 3 cromossomos B, de morfologias B_M , B_{St} e B_a , *A. Eigenmanniorum*: entre um e dois B_M (Torres-Mariano e Morelli, 2008); *A. altiparanae*: um pequeno B acrocêntrico (B_a) (Hashimoto *et al.*, 2008); *A. mexicanus*: de um a dois B_a (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007), *A. jordani*: de um a dois B_m (Silva *et al.*, 2015) e *A. schubart*: um macro B metacêntrico (B_M) (Moreira-Filho *et al.*, 2001). Com exceção de *A. jordani* e *A. sp. B*, as quais não possuem registros de grau heterocromático, os demais cromossomos B esboçam um padrão totalmente heterocromático. Especificamente em *A. mexicanus*, um dos B_a apresentou marcações sutis de microssatélites $(CA)_{15}$ e $(GATA)_8$, além de sítios mais fortes de $(GA)_{15}$ (Piscor e Parise-Maltempi, 2016). Em nenhuma destas espécies são observadas associações de genes funcionais aos cromossomos B, e pouco se sabe sobre a origem destes elementos extras nestas espécies, uma vez que estudos direcionados a esta finalidade ainda necessitam ser realizados.

Para a espécie *A. fasciatus* o primeiro registro de cromossomos B é creditado à Moreira-Filho *et al.* (2001). Um macro B metacêntrico (B_M) totalmente heterocromático. Posteriormente, outras ocorrências foram reportadas: macro B subtelocêntrico (B_{ST}) (Hashimoto *et al.*, 2011) e B médio subtelocêntrico (B_{St}) (Silva *et al.*, 2016). Em todos os morfotipos de B desta espécie, há a presença de sequências microssatélites $(AC)_{15}$, entretanto, o satDNA As51 é observado apenas no B_M . Já sequências H1 são restritas ao B_{St} . Esta é a espécie que apresenta a maior variedade de morfologias descritas, bem como um maior número de supranumerários portando genes

funcionais (18S e H1). Como há um número grande de populações que apresentam citótipos de forma intra e inter específicas (desde $2n=45$ a $2n=50$ cromossomos) (Medrado *et al.*, 2008; Kavalco *et al.*, 2013), associações ligando processos de hibridização à origem dos supranumerários nesta espécie estão sendo levantadas (Pazza *et al.*, 2006).

Já em relação a *A. scabripinnis paranae*, Porto-Foresti *et al.* (1997) analisaram a frequência dos cromossomos B associados a densidade populacional ao longo de três pontos, amostrados ao longo de um córrego. No primeiro ponto, os autores inferiram uma população composta por aproximadamente 212 indivíduos, dos quais, 35 foram analisados, e destes, 23 apresentaram B_M . No segundo, a população foi estimada em cerca de 650 indivíduos, 20 foram cariótipos, e apenas dois detinham um B_M . No terceiro ponto, a população foi estimada em um N de 107 indivíduos, 10 foram analisados, e apenas um apresentou B_M , conferindo ausência de relação entre a frequência do B_M e a densidade populacional, porém a presença de efeitos adaptativos propiciados pelos cromossomos B aos exemplares viventes do primeiro ponto amostrado não está totalmente descartada. De acordo com Maistro *et al.* (1992), a maioria dos supranumerários reportados para esta espécie são inteiramente heterocromáticos, apresentando ainda, padrão de replicação tardia, evidenciado pela incorporação de BrdU, um derivado da Uridina análoga à Timidina, o que lhe confere capacidade de se incorporar ao DNA durante a fase de síntese (fase S).

Em relação à sua origem em *Astyanax*, Maistro *et al.* (1999) sugerem que o cromossomo B_M de *A. scabripinnis* teria surgido pela não disjunção do primeiro par de cromossomos metacêntricos, formando um elemento trissômico, que posteriormente, teria seguido seu próprio caminho evolutivo. Mestriner *et al.* (2000) analisando células meióticas de *A. scabripinnis* verificaram que o cromossomo B não segue um padrão de

herança mendeliana, formando univalentes auto pareados de seus braços. Além disso, mapearam um tipo de DNA satélite no cromossomo B de *A. scabripinnis* obtido a partir da enzima de restrição *KpnI*, denominado As-51. A posição simétrica deste satDNA em ambos os braços do cromossomo B, somado ao seu auto pareamento na meiose, permitiu aos autores proporem que este cromossomo B seria um isocromossomo, formado inclusive, a partir da divisão incorreta e não disjunção das cromátides do par cromossômico 24, rico em sequências As-51. Posteriormente, Néo *et al.* (2000) observaram padrões similares, corroborando as hipóteses sugeridas por Mestriner *et al.* (2000). Alguns anos mais tarde, Vicari *et al.* (2011) fortaleceram a hipótese de origem intraespecífica do B_M de *A. scabripinnis* a partir da formação de um isocromossomo baseando-se em resultados obtidos por pintura cromossômica com uma sonda B-específica e *FISH* com sondas satDNA As-51 e Cot-1. Mais recentemente, Barbosa *et al.* (2017) constaram acúmulos de microsatélites CA, CAC e GA na região telomérica e intersticial do cromossomo B desta espécie.

Em uma população natural de *A. bockmanni* Daniel *et al.* (2012) observaram três morfotipos de cromossomos B: um macrocromossomo B (B_M) e dois microcromossomos B (B_a e B_m), além de significativa variação numérica intraindividual destes elementos, com registros de dois microcromossomos B em uma mesma célula, mas nunca células carregando um macrocromossomo B conjuntamente a um microcromossomo B. Esta presença simultânea de ambos morfotipos de cromossomos B em um mesmo indivíduo levaram os autores a proporem que os cromossomos B desta espécie poderia ter se originado por isocromossomo. Elevados índices de instabilidade mitótica também foram registrados entre os exemplares analisados. Os autores informam ainda que os microcromossomos B observados revelam um padrão parcial de heterocromatina constitutiva, e o macrocromossomo B esboça um padrão totalmente

heterocromático. Anteriormente, Hashimoto *et al.* (2011) também reportaram a ocorrência de B_m para esta espécie, porém, não verificaram instabilidade mitótica nem a presença de macrocromossomos B entre os indivíduos analisados. Adicionalmente, os microcromossomos B desta espécie indicam elevada incidência de elementos transponíveis, mais especificamente os da família Rex (Rex1, Rex3 e Rex6) (Daniel *et al.*, 2015b). Microssatélites (AC)₁₅ também são reportados nos B_m e B_M desta espécie (Silva *et al.*, 2016).

Para investigar a origem dos cromossomos B de *A. paranae*, Silva *et al.* (2014) utilizaram sondas de DNA B-específicas obtidas por microdissecção cromossômica de apenas um dos braços do cromossomo B_M. A aplicação da *FISH* indicou sinais de hibridação em todo o cromossomo B_M, ou seja, homologia completa entre os dois braços deste supranumerário, indicando que o cromossomo B de *A. paranae* apresenta características de um isocromossomo. Os autores observaram ainda, sinais de histona H1 e rDNA 18S simetricamente em ambos os braços do cromossomo B_M, além de marcações sintênicas nos pares dois e 23, os quais, poderiam comportar-se como possíveis cromossomos antecessores do cromossoma B, suportando ainda mais a hipótese de que o cromossomo B de *A. paranae* trata-se de um isocromossomo. Recentemente, com base em análises satDNA Silva *et al.* (2017) corroboraram esta hipótese. Além disso, salvas algumas exceções, esta classe cromossômica é observada quase que exclusivamente em indivíduos do sexo feminino, como já reportado previamente por Maistro *et al.* (1992), Porto-Foresti *et al.* (1997), Moreira-Filho *et al.* (2001), Abellini *et al.* (2014), sugerindo que supranumerários poderiam ter algum papel importante na determinação sexual desta espécie.

Por fim, ao que parece ainda não há uma fórmula resumida que exprima a origem de todos os morfotipos e tamanhos de cromossomos B nas 12 espécies de

Astyanax portadoras destes elementos, porém, Moreira-Filo *et al.* (2001) defende a hipótese de uma origem comum dos supranumerários do tipo B_M reportados em *A. fasciatus*, *A. schubart* e *A. scabripinnis*. Recentemente, Silva *et al.* (2016) baseados em análises cito-moleculares mais modernas, também propuseram uma origem comum dos supranumerários B_M de *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. paranae*, porém, análises mais robustas envolvendo sequenciamento de geração e testes de expressão gênica se faz necessário para verificar o conteúdo destes cromossomos B em nível de sequência, e dessa forma corroborar ou refutar uma hipótese de origem comum do B_M entre estas espécies.

Perspectivas sobre o conhecimento dos cromossomos supranumerários: ênfase em Astyanax

Desde a sua descoberta, há mais de um século, estudos envolvendo supranumerários têm sido palco de pesquisa entre diversos estudiosos mundo afora. Tais estudos foram conduzidos pela citogenética clássica ao longo de boa parte do século 20, onde, a partir dos anos 90 somou-se à citogenética molecular, que teve seu ápice ao longo dos anos 2000, por meio da inserção da pintura cromossômica, técnica que foi e ainda é reconhecida como uma importante aliada na busca de informações sobre o compartilhamento de sequências entre cromossomos de uma mesma espécie ou entre espécies relacionadas (Vicari *et al.*, 2011; Voltolin *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014, 2016; Penitente *et al.*, 2016; Ruban *et al.*, 2017). Desde então esta prática têm sido aperfeiçoada, e o isolamento de regiões cromossômicas específicas se tornaram possíveis (Senger *et al.*, 1990).

Atualmente, estudos desta natureza são mais voltados à construção de bibliotecas banda-específicas e mapeamento físico de cromossomos de interesse na forma de pintura cromossômica ou hibridação cruzada, quando o material genético de uma espécie é utilizado na forma de sonda para mapear sítios ou cromossomos de interesse em outra espécie, processo também chamado de *Zoo-FISH* (Guerra, 2004). Nesse sentido, cromossomos supranumerários têm ganhado cada vez mais adeptos e estudiosos (Diniz *et al.*, 2008; Voltolin *et al.*, 2013; Pansonato-Alves *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014, 2016; Scudeler *et al.*, 2015; Penitente *et al.*, 2016), e embora estas metodologias tenham fornecido achados de suma importância ao longo dos anos, apresentam limites conclusivos em nível molecular (Valente *et al.*, 2017). Por outro lado, análises genômicas e ferramentas de bioinformática têm alavancado investigações massivas a respeito das estruturais e funcionalidades relacionadas aos cromossomos B, questões pouco pensadas até alguns anos atrás (Valente *et al.*, 2017).

Para suprir esta demanda em se gerar cada vez mais conhecimento sobre esta classe cromossômica (supranumerários), sequenciamentos massivos de nova geração (NGS) têm fornecido uma série de marcadores em organismos considerados não modelos (Seeb *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2014; Utsunomia *et al.*, 2016). Nesse sentido, a combinação entre NGS à bioinformática permitem novas formas de identificar sequências específicas presentes nos cromossomos B, revelando uma riqueza de dados moleculares relevantes para estudos acerca de sua origem, manutenção e evolução (revisão em Ruban *et al.*, 2017). Por outro lado, tanto metodologias citogenéticas clássicas quanto cito-moleculares ou moleculares, obviamente têm suas vantagens e desvantagens, onde o uso destes marcadores em conjunto pode proporcionar informações e respostas bem interessantes de acordo com o problema biológico levantado (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2014).

Nesse sentido, Ruiz-Ruano *et al.* (2016) descreveram o satelitoma do gafanhoto *Locusta migratoria*, o que certamente abriu novas perspectivas sobre a distribuição desta classe de DNA em animais. Posteriormente, por meio de análises de alto rendimento, Ruiz-Ruano *et al.* (2016b) mostraram uma ascendência de um tipo morfológico de cromossomo B no gafanhoto *Eumigus monticola*, comprovando que cromossomos B de origem intraespecífica podem abrigar diversas sequências satDNA B-específicas. Em outro trabalho, Vozdova *et al.* (2017) descobriram uma extensa heterogeneidade de sequências satélites entre Canidae, indicando estreitas relações evolutivas entre as raposas vermelha e do ártico.

Em peixes, o enfoque maior acerca de satDNAs têm sido utilizado para uma maior compreensão da origem e comportamento de cromossomos B. Nesse sentido, um dos primeiros satDNA isolados é o denominado As51, isolado do cromossomo B de *A. scabripinnis*, o qual se mostrou simétrico em ambos os braços deste supranumerário (Mestriner *et al.*, 2000). Combinando sequenciamentos Sanger e NGS à PCR e *FISH*, Utsunomia *et al.* (2017) analisaram a variação e abundância de sequências MsaSat01-177 em dez espécies de Characidae, reportando extensa variação deste marcador entre elas, além de um amplo conhecimento dessa família satDNA nas espécies analisadas. Logo, estudar estas sequências significa avançarmos no conhecimento da organização genômica e a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nos mais diversos organismos.

Para as espécies que compõem o grupo *Astyanax*, o uso conjunto destas metodologias têm gerado conhecimentos interessantes dos mecanismos relacionados a processos evolutivos, origem, rearranjos e diferenciação de cromossomos B. Dessa forma, Silva *et al.* (2017) isolaram e validaram 45 famílias de DNA satélites (satDNA) obtidas do genoma de *Astyanax paranae* através de sequenciamento Illumina. A análise

simultânea da localização cromossômica de 35 (dos 45) satDNAs nas espécies *A. paranae*, *A. fasciatus* e *A. bockmanni* revelou que a maioria destes satélites são compartilhados entre as três espécies, inclusive com padrões altamente semelhantes de distribuição cromossômica. A natureza isocromossômica dos cromossomos B nessas espécies foi corroborada pela localização simétrica de muitos satDNAs em ambos os braços dos supranumerários. Além disso, os autores verificaram ainda uma simetria inferior observada no cromossomo B de *A. fasciatus*, sugerindo que o cromossomo B metacêntrico desta espécie é mais antigo que os demais cromossomos B de mesma morfologia reportados em *A. paranae* e *A. bockmanni*, reforçando a hipótese de que estes cromossomos B descenderam de um cromossomo B ancestral comum às três espécies. Ainda segundo os autores, estes resultados levantam novos questionamentos sobre as diferentes hipóteses anteriormente sugeridas sobre a origem dos cromossomos B em *Astyanax*: os cromossomos B encontrados em diferentes espécies deste gênero podem sim ter derivado de um cromossomo B ancestral, mas podem ter evoluído a diferentes taxas entre estas espécies, ou seja, mais rapidamente em *A. fasciatus* que nas demais.

Adicionalmente, como mencionado anteriormente, neste grupo a hipótese de que cromossomos B possam se originar a partir de processos de hibridização têm sido recorrente, como já confirmado em abelhas (Tosta *et al.*, 2015) e sugerido inclusive para *Astyanax* (Silva *et al.*, 2016) - hibridização é conceituada como a união de patrimônios genéticos distintos, resultando em proles com características intermediárias de ambos parentais (Mayr, 1963). Em peixes, estas evidências já foram reportadas em *Poecilia formosa*, um híbrido envolvendo as espécies *Poecilia mexicana* e *Poecilia latipinna* (Camacho, 2000; Schedina *et al.*, 2014).

Nesse sentido, visando analisar a hipótese de que processos de hibridização ocorrem entre espécies e gêneros próximos, Goes *et al.* (*in prep.*) produziram linhagens híbridas entre espécies *A. altiparanae* ($2n=50$) x *A. fasciatus* ($2n=46$), resultando em proles com $2n=48$ cromossomos; *A. altiparanae* ($2n=50$) x *A. schubarti* ($2n=36$), resultando em proles com $2n=43$ cromossomos; *A. altiparanae* ($2n=50$) x *A. mexicanus* ($2n=50$), resultando em proles com $2n=50$ cromossomos, e *A. altiparanae* ($2n=50$) x *Hyphessobrycon anisitsi* ($2n=50$), resultando em proles com $2n=50$, 51 e 52 cromossomos, associando seus padrões cito-cromossômicos à complexos de espécies, bem como a uma possível origem interespecífica de seus cromossomos B. Curiosamente, os cromossomos B presentes nos parentais apresentaram padrões heterocromáticos diferentes, facilmente distinguíveis dos cromossomos A. Além disso, em trabalho recente, produtos híbridos envolvendo espécies de *Astyanax* e espécies de gêneros próximos desenvolvidos por Piva *et al.* (2018) se mostraram sexualmente viáveis. Logo, produtos híbridos oriundos entre espécies de *Astyanax* portadoras de números diploides distintos seria um processo completamente viável, e que poderia ocasionar no acúmulo de cromossomos adicionais, podendo ser transmitidos à geração posterior, fixando-se na população na forma de cromossomos B.

Em suma, técnicas até há pouco tempo aplicadas e enfocadas apenas em outras áreas de estudos (tais como modelagem de nicho, sequenciamento massivo de cromossomos B, marcadores qPCR e cruzamentos dirigidos) hoje têm ganhado mais espaço na construção de conhecimentos sobre cromossomos adicionais, principalmente em espécies do gênero *Astyanax* devido à ampla distribuição geográfica, presença e polimorfismos de forma e tamanho de cromossomos B em diversas espécies e populações distintas. Certamente, a aplicabilidade destes métodos modernos de sequenciamento associados à bioinformática lançarão uma nova perspectiva sobre os

cromossomos B, aumentando de forma significativa o nosso conhecimento sobre a sua dinâmica genômica e evolutiva, fornecendo subsídios para inferências mais completas sobre essa classe cromossômica em *Astyanax* e outras espécies de peixes neotropicais, uma vez que diversos fatores envolvendo esta classe cromossômica ainda permanecem como um mistério, dentre eles, a sua importância fisiológica ao hospedeiro.

Referências bibliográficas

A bibliografia correspondente a este capítulo encontra-se no tópico “Referências bibliográficas” ao final desta tese.

CAPÍTULO 2

Modelagem de nicho preferencial das espécies e
populações do gênero *Astyanax*: ênfase em
cromossomos B

CAPÍTULO 2

Modelagem de nicho preferencial das espécies e populações do gênero *Astyanax*: ênfase em cromossomos B

Resumo

Espécies do gênero *Astyanax* normalmente apresentam $2n=50$ cromossomos, além de diversos polimorfismos, dentre eles cromossomos B (elementos extras aos cromossomos autossômicos), também descritos em diversos grupos animais e vegetais, porém, até o momento estudos envolvendo possíveis relações bióticas e abióticas à dispersão de cromossomos B entre espécies e populações de *Astyanax* ainda são muito dispersos e pouco conclusivos. Assim, averiguamos possíveis ligações entre nicho preferencial e presença (B+) ou ausência (B-) de cromossomos B entre populações de *Astyanax* através de técnicas de modelagem de nicho preferencial representativo de áreas potenciais em cenários do passado (6.000 (MH) e 22.000 (LGM) anos atrás), presente e futuro (2.060). Nos períodos MH e LGM observamos ampla ocorrência de populações B+ e B- em boa parte do Sudeste, Norte, Centro-Oeste e BA. Já no presente, vimos áreas climaticamente favoráveis de populações B+ e B- em parte de SP, MG, PR, RJ, MT e ES. Para 2.050 a área preferencial B+ concentra-se em parte de MG, RJ e SP. Adicionalmente, todas populações B+ encontram-se numa mesma área no presente, MH, LGM e futuro, o que poderia representar uma zona climaticamente estável desde o LGM, já que nenhuma população B- foi mantida fora desta área. Após, populações da espécie *A. bockmanni* foram utilizadas para confrontar as projeções de possíveis populações B+ e B- via qPCR da proteína NUSAP. Adicionalmente, análises moleculares com base no sequenciamento de mtDNA D-loop foram utilizadas para complementar as informações levantadas. Em suma, concluímos que os modelos de distribuição se mostraram efetivos à proposta, porém, ainda são ferramentas intermediárias em um estudo biogeográfico ou ecológico, e não finais.

Introdução

Os peixes representam o grupo mais diversificado, dentre os vertebrados, principalmente os que compreendem a região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2006), com 154 espécies representadas no gênero *Astyanax* (Eschmeyer, 2017), as quais apresentam ampla variação quanto à morfologia e distribuição cromossômicas intra e interpopulacionais (Fauaz *et al.*, 1994; Mestriner *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001). Outra importante característica observada em algumas espécies de *Astyanax* é a presença de cromossomos B, que em sua maioria são facilmente identificados devido ao seu padrão completamente heterocromático (Moreira-Filho *et al.*, 2001; Artoni *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012).

Cromossomos B são definidos por Houben *et al.* (2013) como elementos adicionais ao conjunto de cromossomos normais, os quais não são essenciais ao ciclo de vida do indivíduo que o carrega, não apresentam herança mendeliana, podem ter origens distintas e não acompanham o ciclo evolutivo dos cromossomos autossômicos. Nesse sentido, Oliveira *et al.* (2009) postulam que boa parte do conhecimento acerca dos supranumerários remetem à peixes provindos de regiões influenciadas pela poluição, represamentos, ou ainda, alterações na temperatura e volume d'água. Adicionalmente, segundo os autores, cromossomos B podem ser co ou subprodutos deste estresse ambiental ao qual o peixe estaria inserido, originados inclusive por alterações dos cromossomos do complemento A, e consequentemente mantidos nas populações. Sua origem dentro e entre as populações ainda permanece um mistério, mas que aos poucos vêm ganhando novas ferramentas de estudos.

Especificamente em *Astyanax*, há a incidência de cromossomos B em pelo menos 12 espécies (tabela 1; figura 1) distribuídos nas mais variadas formas e

tamanhos. Porém, apesar desta elevada recorrência em espécies do grupo, não há evidências de que a presença de cromossomos B configure vantagens significativas aos organismos que os mantêm. Além disso, não há trabalhos que tentem relacionar locais de ocorrência de populações B⁺ e B⁻ à sua geografia. Nesse sentido, modelos de distribuição espacial e de nicho preferencial têm sido cada vez mais utilizados na projeção espaço-geográfica e padrões de ocorrência de espécies, principalmente na forma de mapas probabilísticos, representando um método empírico eficiente para inferências estatísticas da distribuição de determinadas espécies sob a influência de diferentes processos químicos, físicos ou biológicos (Zimmermann *et al.*, 2010). Estas abordagens já têm sido utilizadas com sucesso para avaliar a distribuição potencial de espécies em análises biogeográficas (Siqueira e Durigan, 2007), conservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (Engler *et al.* 2004), reintrodução de espécies (Hirzel *et al.* 2002), perda de biodiversidade (Polasky e Solow 2001), dentre outros.

Nesse sentido, alguns algoritmos têm sido aplicados na confecção de modelos representativos dessas condições, projetando áreas potenciais de ocorrência das espécies alvo (Giannini *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos associando genética à eventos climáticos ou geológicos ainda são raros e pouco expressivos em peixes, principalmente devido à dificuldade em se medir as condições e mutações ambientais, frequentemente associadas às ações antrópicas ou eventos físico/químico/biológicos naturais (Manel *et al.*, 2003). De uma forma geral, a abordagem baseada na teoria de nicho usa a predição da distribuição com mapas associadas às coordenadas de ocorrência e fatores ambientais onde a espécie fora reportada (Patten e Auble, 1981). Assim, ao unirmos processos evolutivos às características ambientais que poderiam afetá-los (Manel *et al.*, 2003).

Dessa forma, utilizamos neste estudo técnicas de modelagem de nicho ecológico preditivo para explorar possíveis fatores responsáveis pela determinação dos limites de

distribuição de populações de *Astyanax* B+ e B-, caracterizando o conjunto de variáveis ambientais pertencentes à sua ocorrência geográfica conhecida, e subsequentemente projetando para o espaço geográfico a distribuição das áreas que combinam esse conjunto de variáveis. Posteriormente, elegemos a espécie *A. bockmanni* para confrontar as regiões de possível ocorrência de populações B+ e B- apontadas pela projeção da modelagem. Para isso, utilizamos um marcador qPCR da proteína NUSAP, a qual pôde ser quantificada em indivíduos B_M. Após a identificação de possíveis populações B_M⁺, realizamos análises baseadas em mtDNA para explorar dados que pudessem associar ou diferenciar estas populações.

Material e métodos

Com o intuito de inferir relações biogeográficas, bióticas e abióticas à ausência/presença de cromossomos B no gênero *Astyanax*, foi efetuado um levantamento completo de cromossomos B em todas as espécies e populações do grupo, sendo considerados apenas registros oriundos de ambientes naturais, com dados citogenéticos e coordenadas geográficas reportadas em artigos acadêmicos. Tão logo uma espécie era identificada como B+, todas as demais populações relacionadas à esta espécie eram computadas, uma vez que as mesmas foram utilizadas para calibragem e análises estatísticas necessárias.

Os padrões de distribuição da ocorrência de populações B+ em *Astyanax* foram inferidos em cinco métodos de modelagem: *boosted regression trees* (BRT), *generalized linear model* (GLM), *generalized additive model* (GAM), *random forests* (RF) e *support vector machines* (SVM) (Elith *et al.*, 2006; Vasconcelos, 2014; Naimi e Araújo, 2016). Para cada um dos modelos executados, 80% do conjunto total dos pontos

de ocorrência (B+ e B-) foram usados para a calibração do modelo de modelagem a ser utilizado, e os demais 20% utilizados para avaliar e validar o mesmo modelo. Logo, este procedimento foi replicado 10X utilizando o procedimento de sub-amostragem aleatória sem reposição (Naimi e Araújo, 2016). Após, os modelos foram avaliados pela curva característica de operação do receptor (ROC curve), cuja área sob a curva (AUC) varia de 0 a 1, onde 0 = ausência; 0,5 = predição aleatória; e 1,0 = elevado poder preditivo (Elith e Burgman, 2002). Para fins de maior confiabilidade utilizamos uma segunda métrica *true skill statistic* (TSS), a qual é dependente do limiar, e considera de forma similar os erros de comissão e omissão, variando de -1 (modelos semelhantes a uma predição aleatória) a 1 (modelos com perfeito ajuste estatístico).

A seleção das variáveis climáticas predictoras considerou-se todas as variáveis climáticas disponíveis na plataforma WorldClim (http://www.worldclim.org/cmip5_5m) (Hijmans *et al.*, 2005), submetidas à análise do fator de inflação de variância (Naimi e Araújo, 2016). A projeção do nicho ecológico potencial das espécies em cenários do passado (Mid-Holoceno/MH – há 6.000 e Last Glacial Maximum/LGM – há 22.000) e futuro (2060) baseou-se em dois caminhos representativos emissores de CO₂ (CCR 2.6 e CCR 8.5) em três modelos globais: Community Climate System Model (CCSM4); New Global Climate Model of the Meteorological Research Institute (MRI-CGCM3) e Institute Pierre Simon Laplace (IPSL-CM5A-LR).

As diferenças inerentes de cada algoritmo da modelagem e as diferentes bases de dados utilizadas foram alinhadas em uma previsão consensual para cada cenário (presente, MH, LGM e futuro) com populações B+ e B-. O mapa consensual foi gerado calculando a média da adequabilidade climática de cada *grid*. O procedimento de modelagem foi realizado separadamente: a) populações B-; b) populações B+. As

projeções consensuais para cada período preditivo (passado, presente e futuro) foram sobrepostas de modo que os pontos de ocorrência das populações portadoras de cromossomo B fossem plotados para checar se estariam localizados na área de sobreposição das quatro predições. Da mesma forma, com base nos tratados assinados de redução de queima de combustíveis fósseis, taxa de desmatamento, poluição, produção de lixo, produção agropecuária, consumo de água, aumento da população, dentre outros, foi modelado um mapa consensual para prever os padrões climáticos que permitiriam ocorrências de populações B+ em 2060. A construção do mapa levou em consideração a média de os países atingirem ou não suas metas nestas reduções.

O processamento das informações e geração dos mapas binários de predição foram realizados no programa RStudio (extensão do Programa R), plotados no programa Quantum GIS 1.6.0 copiapó, utilizando imagens de satélite disponíveis na base de dados da National Aeronautics and Space Administration - NASA (<https://www.nasa.gov>) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (<https://www.embrapa.br/monitoramento-por-satelite>) e posteriormente editados no programa Adobe Photoshop CS5.

Após esta etapa, foi feita a quantificação do gene NUSAP em indivíduos reconhecidamente portadores de cromossomos B_M, B_m e B_a da espécie *A. bockmanni* por meio de técnicas citogenéticas. Em seguida, o marcador foi aplicado em todas as populações de *A. bockmanni* (tabela 2). O marcador B_M utilizado foi obtido com base no gDNA e transcriptoma de exemplares de *A. paranae* 0B e +B em parceria com o Laboratório de Biologia de Peixes, IB Unesp Botucatu.

O DNA genômico total foi isolado com o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega” de acordo com as orientações do fabricante. O fragmento mtDNA D-loop foi amplificado via *Polimerase Chain Reaction* (PCR) com base nos

primers H16498 5'-CACCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M 5'-ACATGAATTGGAGGTATACCAGT-3' (Prioli *et al.*, 2002). Após, as amostras foram purificadas por meio da enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation) e montadas na placa de sequenciamento com base no Kit "Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems), e submetidas a um sequenciador automático ABI 3730 XL Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California).

A diferenciação genética entre as populações foi feita pelo teste estatístico *F* (Wright, 1949; 1965) pelo teste de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005), e os dendogramas foram criados no programa FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) pelo algoritmo *Median-joining*.

Resultados

Para o cenário atual de probabilidade de ocorrência de populações B+ e B-, a modelagem revelou áreas climaticamente favoráveis em praticamente todo o estado de SP, PR e parte dos estados de MG, RJ, MS, SC, ES, RS e BA (figura 2a). Em relação apenas às populações B+, observamos áreas potencialmente favoráveis em parte dos estados de MT, SP, PR, MG, ES e RJ (figura 2b).

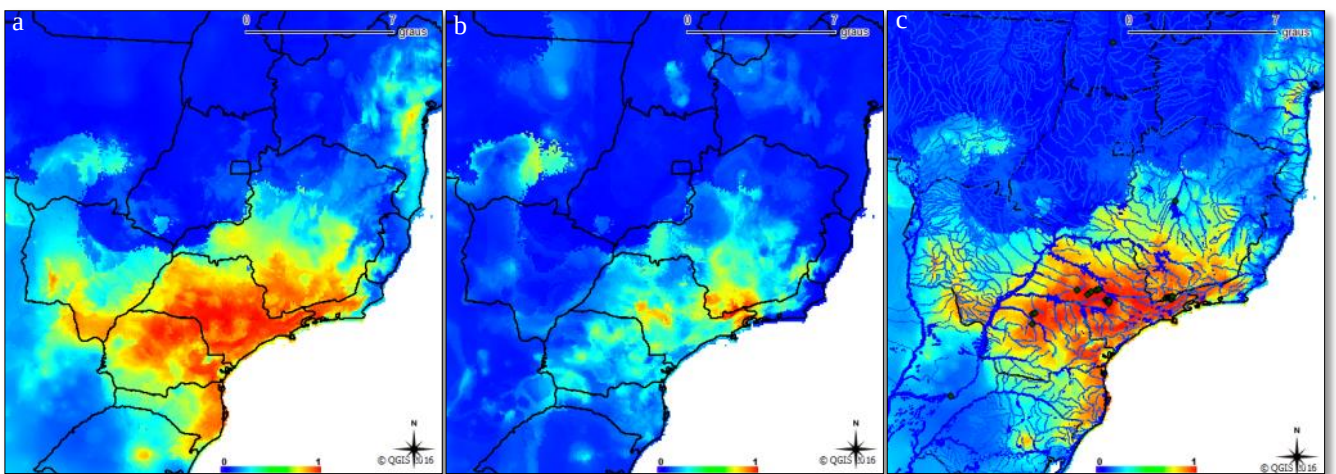


Figura 2: projeção de regiões climaticamente favoráveis de ocorrências de populações B+ e B- em cenários dos dias atuais. Em a, populações B+ e B-. Em b, regiões climaticamente favoráveis B+. Em c, mapa geral das populações com pontos já reconhecidos de populações B+. A barra colorida indica a probabilidade de ocorrência de populações B+.

Adicionalmente, partindo da hipótese de que diversas espécies de *Astyanax* coexistiram em cenários passados, e que estas populações estariam sujeitas às mesmas pressões seletivas, projetamos um possível padrão de distribuição em cenários do passado (Mid-Holoceno – há 6.000 e Last Glacial Maximum – há 22.000) em relação aos dias atuais. Ambos cenários LGM e MH indicaram ampla ocorrência destas mesmas espécies e populações B+ e B- em todos estados da região Sudeste; praticamente todo o estado de SC, PR e MS, e parte dos estados do RS, MT, GO e BA (figura 3), entretanto, observamos um declínio de áreas potenciais entre estes períodos, principalmente nas áreas das regiões Norte e regiões hoje tomadas pelo Oceano Atlântico (figura 3b). Entre

os últimos 6.000 anos até a atualidade poucas mudanças são observadas em relação a perda ou ganho de áreas potenciais de ocorrência de populações de *Astyanax* B+ e B-.

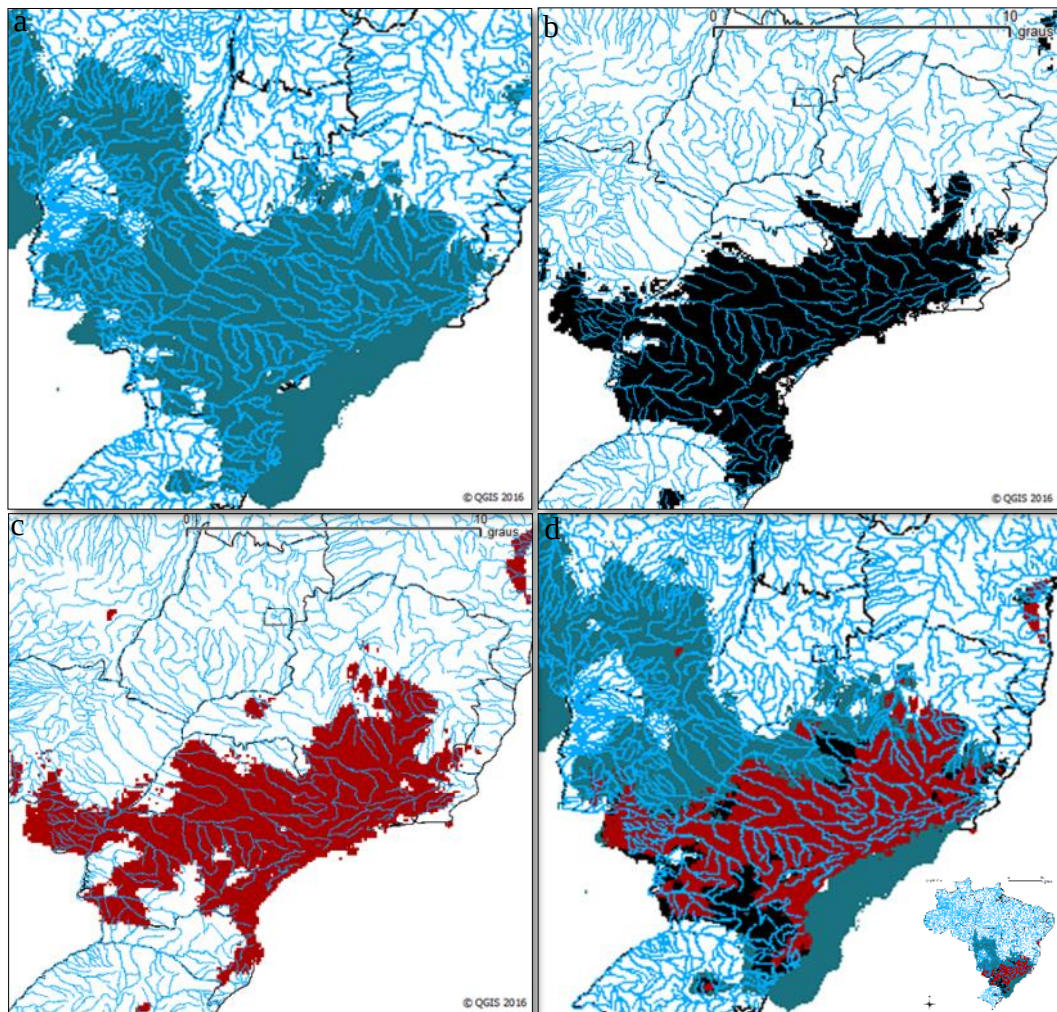


Figura 3: projeção de regiões climaticamente favoráveis à ocorrência de populações de *Astyanax*, B+ e B- em cenários LGM - 22.000 e MH - 6.000 anos atrás: a e b, respectivamente. Em c, projeção para os dias atuais. Em d, sobreposição dos três cenários modelados.

Por outro lado, para o ano de 2.060 as plotagens indicam um grande afunilamento de áreas potenciais de ocorrência de populações B+ quase que exclusivamente em parte dos estados de SP, MG e RJ (figura 4b), caracterizando um imenso declínio de áreas potenciais quando comparado às projeções dos dias atuais (figura 4a).

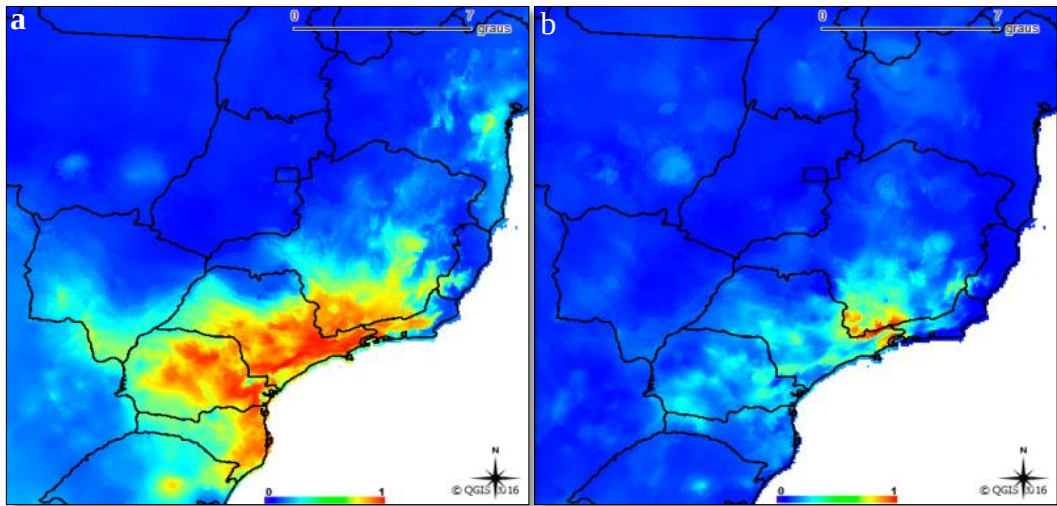


Figura 4: projeção de áreas climaticamente favoráveis de populações de *Astyanax* B+ e B- em cenários do futuro (2060). Em a, regiões favoráveis à ocorrência de populações B-. Em b, regiões favoráveis à ocorrência de populações B+. A barra colorida indica a probabilidade de ocorrência de populações B+.

Curiosamente, quando comparamos populações B+ descritas atualmente (i.e. regiões específicas de ocorrência nos estados de MT, SP, PR, MG e RJ) com suas unidades morfoestruturais (planícies, planaltos e depressões), constatamos que todas as populações B+ encontram-se exclusivamente em locais com altitude intermediária (1.000 m). Por outro lado, para o cenário futuro, estas mesmas populações B+ (i.e. parte dos estados de SP, MG e RJ) tenderão a ocorrer apenas em ambientes com altitude elevada (1.500 m ou mais) (figura 5).

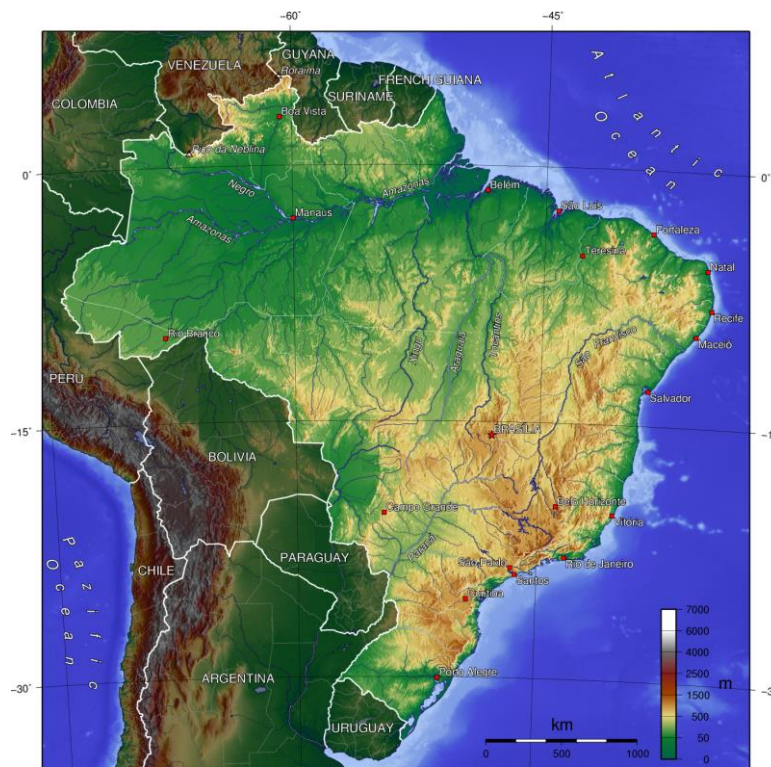


Figura 5: unidades morfoestruturais do Brasil.

Dispondo de material biológico de populações de *A. bockmanni* previamente analisadas citogeneticamente, validamos o marcador qPCR B_M em indivíduos portadores de cromossomos B_M , o qual se mostrou com elevados níveis para esta morfologia e tamanho. Os demais morfotipos de cromossomos B não apresentaram uma quantificação significativa para este marcador, sendo ignorados para esta análise. Em seguida, o marcador qPCR B_M foi aplicado em populações estratégicas que se encontravam nas regiões projetadas na modelagem (figura 4a), tanto portadoras quanto não portadoras de cromossomos B (para verificar as populações utilizadas vide tabela 1 e tabela complementar 1), o que nos permitiria confirmar populações com ou sem cromossomos B em seu genoma, mesmo que restrita apenas à morfologia metacêntrica. Assim, nossos resultados indicaram uma quantificação expressiva da proteína NUSAP em indivíduos presentes em regiões do presente reportadas como populações B+ (tabela 3).

Tabela 3: análises prévias de alguns exemplares após a realização da qPCR com o gene da proteína NUSAP. RQ= quantificação relativa. ■ >100 cópias.

		NUSAP		HPRT		
Sample Name	Target Name	C _T	C _T Mean	C _T	C _T Mean	RQ
007 - Batalha	NUSAP	22,0417004	22,1597443	29,2013073	28,642355	89,425
007	NUSAP	22,2777882	22,1597443	28,0834026	28,642355	controle
009 - Batalha	NUSAP	22,2038612	22,3526917	28,9370174	29,1258888	109,379
009	NUSAP	22,501524	22,3526917	29,3147621	29,1258888	controle
075 - Uberaba	NUSAP	22,2413425	22,2321243	30,9429588	30,9485779	420,643
075	NUSAP	22,2229061	22,2321243	30,954195	30,9485779	controle
1* - Jararaca	NUSAP	26,2671242	26,3134308	34,80196	35,0142288	416,103
1*	NUSAP	26,3597355	26,3134308	35,2264977	35,0142288	controle
5151 - Alambari	NUSAP	26,2942829	26,2974014	37,0164032	36,7431488	1394,708
5151	NUSAP	26,3005199	26,2974014	36,4698944	36,7431488	controle
6518 - Alambari	NUSAP	26,3674679	26,3314667	33,7064896	33,1597633	113,638
6518	NUSAP	26,2954674	26,3314667	32,6130371	33,1597633	controle
7677 - Jararaca	NUSAP	18,3931313	18,1459904	26,3794956	26,3794956	300,976
7677	NUSAP	17,8988495	18,1459904	26,3794956	26,3794956	controle
12* - Paulistânia	NUSAP	27,4407177	27,43536	34,3376541	35,7562256	319,764
12*	NUSAP	27,4300022	27,43536	37,1747971	35,7562256	controle

Em relação aos valores Φ_{ST} entre as populações B+, observamos valores desde 0.55396 (Uberaba x Jararaca) a 0.84352 (Batalha x Água da Madalena), o que indica forte estruturação genética entre elas, porém, revelando diferenças significativas entre todas as populações (tabela 4).

Tabela 4: Matriz de distância entre as populações com base nos valores Φ_{ST} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0.00000															
2	0.77357	0.00000														
3	0.72572	0.68873	0.00000													
4	0.78024	0.67014	0.58588	0.00000												
5	0.83182	0.72004	0.72868	0.73766	0.00000											
6	0.88410	0.78351	0.77028	0.82837	0.84430	0.00000										
7	0.92665	0.76941	0.89292	0.87768	0.89518	0.96694	0.00000									
8	0.72039	0.70049	0.55396	0.68999	0.69451	0.70377	0.83668	0.00000								
9	0.79497	0.77082	0.62272	0.76224	0.78181	0.81601	0.89766	0.57415	0.00000							
10	0.81247	0.78956	0.65805	0.78471	0.81947	0.90399	0.93883	0.65709	0.76169	0.00000						
11	0.79820	0.77530	0.72823	0.78730	0.76659	0.76617	0.87274	0.69365	0.76611	0.79632	0.00000					
12	0.80986	0.78395	0.75828	0.80620	0.83128	0.85583	0.90764	0.69802	0.79140	0.84102	0.79262	0.00000				
13	0.76104	0.72064	0.71829	0.76795	0.77348	0.75212	0.84352	0.69284	0.75030	0.76951	0.75678	0.72086	0.00000			
14	0.75060	0.72181	0.64068	0.74119	0.74894	0.76867	0.86595	0.60174	0.70660	0.74133	0.74948	0.58968	0.70315	0.00000		
15	0.72753	0.69963	0.66579	0.72305	0.73737	0.74497	0.84056	0.63574	0.72201	0.73733	0.74911	0.65438	0.69361	0.61266	0.00000	
16	0.78611	0.73461	0.61597	0.73122	0.77893	0.86398	0.92545	0.59183	0.71526	0.79071	0.75084	0.79013	0.71904	0.67979	0.68288	0.00000

1: Água Doce; 2: Itatinga; 3: Uberaba; 4: Riacho sem nome (Aporé); 5: Tibagi; 6: Novo; 7: Água da Madalena; 8: Jararaca; 9: Córrego sem nome (Paulistânia); 10: Lambari; 11: Alambari; 12: Campo Novo; 13: Batalha; 14: Barra Seca; 15: Capivara; 16: Amendoim

Por fim, foi efetuado uma análise AMOVA envolvendo apenas populações de *A. bockmanni* reportados com cromossomos B, onde os valores levantados foram de 73.86% entre populações, e de 23.58% dentro das populações (tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em mtDNA D-loop entre as populações portadoras de cromossomos B.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	3759.591	65.67104 Vb	73.86
Dentro das populações	1886.619	20.96243 Vc	23.58
Total	7099.427	88.91574	

Φ_{ST} : 0.76424

Já o dendograma sinalizou que as populações Batalha e Jararaca são as mais distantes geneticamente, com um grupo formado pelas populações Uberaba-Paulistânia-Jararaca (figura 6).

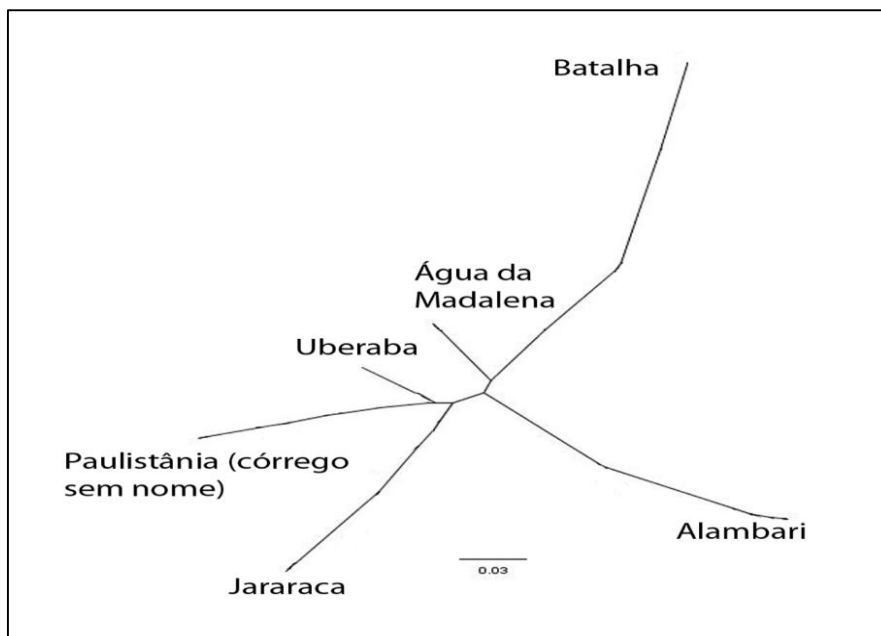


Figura 6: Dendrograma de distância genética entre as populações portadoras de cromossomos B

Discussão

Vimos que em um cenário atual de probabilidade de ocorrência de populações B+ e B-, áreas climaticamente favoráveis de populações B+ são bastante reduzidas. De fato, segundo a literatura, cromossomos B são reportados em sua maioria nos estados de SP, MG e PR (tabela 1). Nas demais regiões, há casos isolados ou nenhum registro de cromossomos B. Adicionalmente, estas são regiões que constantemente sofrem com desmatamentos de matas ciliares em seus rios, depósito excessivo de lixo e dejetos industriais (Zaniboni, 1997). Logo, os diferentes componentes das mudanças climáticas (temperatura, hidrologia e composição atmosférica) poderiam não só afetar os níveis de organização biológica, mas também interagir com outros estressores aos quais águas continentais são rotineiramente expostas (Beer *et al.*, 2010). Com o aumento da temperatura da água e toxicidade dos poluentes, aliados a diminuição dos níveis de O₂ dissolvido, estes efeitos podem ser mais rápido e intensamente absorvidos em riachos e córregos, locais onde muitas espécies de *Astyanax* co-habitam (Vari e Castro, 2007). Assim, em um curto prazo de tempo sua fisiologia e história de vida poderiam ser diretamente afetados por alterações induzidas por mudanças climáticas somadas às ações antrópicas (Ficke *et al.*, 2007). Entretanto, não podemos ignorar que a presença de populações B+ nas áreas restritivas de acordo com a modelagem possa ser fruto da ausência de maiores investigações nas demais regiões.

Em relação à ocorrência de populações B+ em áreas não compreendidas pela modelagem, Delatorre *et al.* (2013) postulam que este tipo de lacunas em modelos de distribuição de espécies pode estar relacionada à ausência de levantamentos nas regiões que possam interconectar essas populações. Além disso, é sabido que ecossistemas aquáticos são caracterizados por complexas interações físicos/químicos/biológicos (Gal

et al., 2014), e apesar de modelos de projeção fornecerem uma imagem estatisticamente confiável de distribuição, nunca poderá fornecer todas as características reais de um sistema (Jorgensen e Fath, 2011), o que somente é possível com visita física a campo.

Ao contrário do que foi observado na distribuição das populações B+ e B- para os dias atuais, os cenários MH e LGM indicaram ampla ocorrência destas mesmas espécies e populações compreendendo significativamente toda a região Sudeste, além de SC, PR e MS, RS, MT, GO e BA. Tendo-se como base que as espécies de *Astyanax* coexistiam em cenários passados e que estas estariam sujeitas às mesmas pressões seletivas, esta diferença de distribuição esboçada nos cenários do passado e presente pode estar associada ao fato de que espécies/populações podem responder de forma diferente a processos geológicos e ambientais comuns (Galván-Quesada *et al.*, 2016). Como consequência, seus padrões evolutivos resultantes também poderiam diferir, pois seriam dependentes de fatores geológicos, ecológicos e sua interação a um estilo de vida específico (Barber *et al.*, 2011).

Nos períodos compreendidos pelos cenários MH e LGM, os oceanos mais frios, e as baixas temperaturas dos períodos glaciais no hemisfério norte diminuía de forma significativa a evaporação de água, e consequentemente as florestas úmidas tropicais e subtropicais deram lugar a vegetações áridas e semi-áridas no hemisfério sul (Hewitt, 2004). Durante o último período glacial (entre 60 e 70.000 anos atrás) a temperatura era 5°C menor, e o nível dos oceanos era 100 m mais baixo (Fiaschi e Pirani, 2009; Suguio e Bigarella, 1990), com a região litorânea aproximadamente 180km mais larga que as métricas atuais (Joly *et al.*, 1999). Isso daria um respaldo sobre a presença de áreas climaticamente favoráveis de ocorrência de populações B+ e B- em regiões hoje compreendidas pelo Oceano. No Brasil, os efeitos dessas mudanças climáticas drásticas na distribuição e evolução das espécies, bem como na retração e expansão dos biomas é

bem estudado somente para o período Quaternário, período que engloba os últimos 2 milhões de anos (Fiaschi e Pirani, 2009; Hewitt, 2004).

Partindo-se da premissa de que águas continentais são particularmente vulneráveis às mudanças climáticas, e que muitas das espécies que ocorrem nestes *habitats* têm suas habilidades limitadas para se dispersar na medida em que o ambiente muda - temperatura e disponibilidade da água interligam-se diretamente ao clima; mudanças climáticas extremas ocorreram neste período, e muitos sistemas estão expostos a diversos estressores antropogênicos (Woodward *et al.*, 2010) - podemos inferir que populações de *Astyanax* que em um outro momento conviviam simpatricamente, teriam reagido de maneira independente às sucessivas e diferentes pressões seletivas. Isso poderia explicar a diferença da distribuição geográfica entre as populações de *Astyanax* de acordo com a modelagem. Vale lembrar que os efeitos das mudanças climáticas sobre diversas espécies de peixes no mundo são reportadas por vários autores (Ficke *et al.*, 2007; Woodward *et al.*, 2010; Poesch *et al.*, 2016).

Nesse sentido, Oliveira *et al.* (2009) propõem que boa parte do conhecimento acerca dos supranumerários remetem à peixes provindos de regiões influenciadas por poluição, represamentos, ou ainda, alterações na temperatura e volumes d'água. Segundo os autores, cromossomos B podem ser co ou subprodutos deste estresse ambiental ao qual o peixe estaria inserido, podendo ser originados, inclusive, por alterações dos cromossomos do complemento A, e conseqüentemente, mantidos nas populações. Existem várias evidências de que, além da variação genética, existem variações epigenéticas entre indivíduos portadores de supranumerários, desencadeadas por diferentes estímulos ambientais (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2015). Se hipotetizarmos a ideia de que estes eventos também possam ter ocorrido nos cenários de

populações B+ no passado, isso daria um respaldo ao surgimento de cromossomos B em *Astyanax* nestas regiões.

Já para 2.060, as projeções afunilam áreas climaticamente favoráveis à ocorrência de populações B+ quase que exclusivamente em parte dos estados de MG, RJ e SP (figura 6b). Adicionalmente quando sobrepomos as imagens modeladas de populações B+ nos diferentes cenários, vemos que todas elas encontram-se numa mesma área sobreposta, porém, quando repetimos a sobreposição das populações B- nos mesmos cenários, nem todas corresponderam às mesmas áreas. Isso pode sugerir que a área composta pelas populações B+ poderia representar uma zona climaticamente estável à manutenção e fixação de supranumerários em *Astyanax* desde o período LGM, uma vez que nenhuma população B+ foi mantida fora desta região climaticamente favorável. Logo, a projeção revela que populações carreadoras de cromossomos B passarão a coexistir, em sua maioria, em áreas serranas destes estados, caracterizadas por clima ameno e ambiente relativamente conservado, onde mudanças climáticas teriam um efeito mais retardado.

Segundo Verburg *et al.* (2003), ao longo das próximas décadas os ambientes aquáticos serão os mais afetados pelas mudanças climáticas. Isso acontecerá principalmente devido aos efeitos sinérgicos do aquecimento global e acidificação dos corpos aquáticos (parcialmente causada por liberação de Nitrogênio), o que poderá acarretar em grande perda de biodiversidade (Sala *et al.*, 2000). De acordo com Malcom *et al.* (2000), algumas espécies que habitam ambientes fragmentados ou aquelas que vivem rodeadas de corpos d'água, cidades e agricultura são as que enfrentam maiores riscos. Somado a isso, ações antrópicas são concentradas nestes estados apontados pela modelagem, principalmente no tocante à degradação de matas ciliares e elevado

acúmulo de lixo em pequenos rios, córregos e riachos, o que evidentemente aumenta a pressão seletiva nos organismos que neles vivem.

Por fim elevados índices NUSAP foram identificados pelo marcador qPCR B_M em exemplares pertencentes à populações B+ de *A. bockmanni* que se encontravam em áreas climaticamente favoráveis de acordo com a modelagem preditiva. Através deste marcador qPCR, cromossomos B_M foram identificados nas populações Batalha, Uberaba, córrego sem nome (Paulistânia/SP) e Jararaca, além da população Alambari (previamente reportado em Daniel *et al.*, 2012) e Água da Madalena (previamente reportado em Silva *et al.*, 2016) (para localização destas populações vide tabela 2). Entretanto, segundo a projeção, cromossomos B também deveriam ocorrer em outras regiões amostradas, como nas populações Sapopema/PR e Bertioga/SP por exemplo, porém, como o marcador qPCR utilizado foi validado apenas para cromossomos B_M, outras formas ou tamanhos de supranumerários poderiam estar presentes nestas populações, e assim não seriam diagnosticados por este marcador.

Portanto, é fato que a presença NUSAP em níveis significativos nos cromossomos B_M, ao menos indica a presença de mais um gene funcional em seu genoma, o que pode caracteriza alguma vantagem em seus portadores, ou ainda à manutenção e transmissão desta classe cromossômica, uma vez que esta proteína tem função de se agrupar e estabilizar microtúbulos por similaridade, promovendo a organização dos microtúbulos do fuso mitótico à sua volta (Raemaekers *et al.*, 2003). Segundo Banaei-Moghaddam *et al.* (2013) cerca de 15% de todos os fragmentos de pseudogenes alocados em cromossomos B seriam transcritos, demonstrando que alguns cromossomos B, mesmo heterocromáticos, podem abrigar genes funcionais (Ruíz-Estévez *et al.*, 2013).

Em ciclídeos africanos do Lago Vitória, Carmello *et al.* (2017) identificaram uma variante do gene *hnRNPQ* inserido no cromossomo B de *A. latifasciata*, além de variações nos níveis de expressão entre os tecidos, sexo e presença/ausência de cromossomos B, observadas através de RT-qPCR, porém, genes que codificam proteínas transcritas em cromossomos B também já foram reportados na planta *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005), canídeos (Yudkin *et al.*, 2007), em gafanhotos *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010) e *Eyprepocnemis plorans* (Ruíz-Estévez *et al.*, 2012, 2013; Navarro-Domínguez *et al.*, 2017), e nos peixes *Rhammatocerus brasiliensis* (Oliveira *et al.*, 2011) *Lithochromis rubripinn* (Yoshida *et al.*, 2011). Também há registros sequências transcritas exclusivamente em cromossomos B de centeio (Carchilan *et al.*, 2009) e veado siberiano *Capreolus pygargus* (Trifonov *et al.*, 2013).

Em relação aos valores moleculares observados entre as populações B+, uma forte estruturação genética se fez presente em todas elas, além de uma significativa diferença genética entre as populações do que dentro das populações, o que foi refletido no dendograma, o qual apresentou apenas pequenas ligações entre elas. Segundo Saadi (1993) áreas tectônicas emergidas há menos de 1.6 milhão de anos teriam contribuído diretamente para a distribuição ictiofaunística centralizadas, particularmente, nos estados de SP, RJ e MG (Mello *et al.*, 2015). Outra característica geológica relevante do sudeste brasileiro, principalmente o estado de SP, é o Arco de Ponta Grossa, um surgimento do porão cristalino da Bacia do rio Paraná (Petri e Fulfaro, 1983) que teria intensificado os movimentos verticais das erosões rochosas, dificultando o fluxo de água e intercâmbios ictiológicos entre os afluentes e riachos ao longo das microbacias presentes nestas regiões (Ribeiro, 2006), áreas que atualmente englobam as regiões onde foram amostradas as populações B+ de *A. bockmanni*, excetuando-se a população

Uberaba. Isso poderia explicar a grande diferença genética apresentada entre estas populações.

Em suma, vimos que a acumulação de sequências repetitivas em cromossomos B parece ser o caminho mais comum em sua diferenciação, hipótese reforçada pela ampla presença da proteína NUSAP quantificada via qPCR, pelo menos em indivíduos B_M. Adicionalmente, a partir da modelagem de nicho preferencial mapeamos um panorama da distribuição preferencial de populações B⁺ e B⁻ do gênero *Astyanax* em cenários do passado, presente e futuro. Por outro lado, também constatamos que estas abordagens somente são possíveis se utilizadas como ferramentas intermediárias, e não conclusivas, pois ainda apresentam diversas limitações, principalmente no que diz respeito à fatores que possam ser inteiramente ligados à fatores evolutivos. Portanto, seu propósito deve ser mais focado na aquisição de informações sobre fatores abióticos e bióticos envolvidos na distribuição da espécie alvo dos estudos para que técnicas mais robustas e conclusivas possam ser aplicadas. Portanto, a integração de ideias e respostas que podem ser escalonadas parece representar um caminho potencialmente promissor, e que certamente deverá ser aprimorado à medida em que novos pesquisadores se debruçam sobre o tema.

Referências bibliográficas

A bibliografia correspondente a este capítulo encontra-se no tópico “Referências Bibliográficas” ao final desta tese.

CAPÍTULO 3

Análises filogenéticas entre populações B⁺ e B⁻
de *A. bockmanni* a partir do mtDNA D-loop

CAPÍTULO 3

Análises filogenéticas entre populações B⁺ e B⁻ de *A. bockmanni* a partir do mtDNA D-loop

Resumo

Astyanax bockmanni é uma espécie abundantemente distribuída em boa parte das bacias hidrográficas brasileiras. Dentre suas características cromossômicas, a ocorrência de cromossomos B é uma das que mais têm chamado a atenção, justamente devido a sua natureza dispensável e mecanismos de manutenção e transmissão ainda pouco conhecidos. Em populações de *A. bockmanni* são apresentados em diferentes formas, número e tamanho. Assim, no presente estudo mapeamos padrões moleculares de mtDNA D-loop entre 16 populações desta espécie (portadoras e não portadoras de cromossomos B), de distintas bacias hidrográficas brasileiras, visando associar possíveis ligações deste marcador à distribuição dos cromossomos B entre elas. Os resultados evidenciaram ampla estruturação populacional e baixo fluxo gênico entre elas, independentemente da presença ou ausência de cromossomos B, porém, a hipótese de isolamento entre elas foi descartado. Tais características, somadas à outras, reforçam a hipótese de que *A. bockmanni* componha na realidade um complexo de espécies. Dentre as populações B⁺, Batalha (bacia do Tietê) é geneticamente a mais distinta e distante das demais. Nesta população registramos apenas a variante B_M, enquanto na bacia do Paraná_Paranapanema são reportadas as variantes B_M, B_m, B_a, provavelmente associados à mecanismos de *drive*. Assim, hipotetizamos que talvez supranumerários em *A. bockmanni* tenham se originado nesta bacia devido à presença destas três variantes de B, e que aos poucos deva colonizar as demais populações.

Introdução

Ao longo dos últimos anos, uma parcela significativa da academia científica mundial têm somado esforços visando aumentar o conhecimento da diversidade biológica e conservação dos recursos genéticos, principalmente da região neotropical, valendo-se desde técnicas tradicionais de estudos de DNA até as mais recentes inovações biotecnológicas aplicadas de forma intra e interespecíficas (Utsunomia *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2017). Assim, têm se destacado estudos voltados à avaliação de processos evolutivos, estimativas de variabilidade genética, análises de zonas de contato entre espécies, fluxo gênico, biogeografia histórica, estruturação populacional, sistemática molecular, inferências filogenéticas e evolutivas, identificação de espécimes processados, dentre outros (Avice *et al.* 1987, Ortí *et al.* 1996).

Somado a isso, o genoma mitocondrial detém diversas particularidades, como a capacidade de codificar praticamente as mesmas proteínas desde leveduras até mamíferos, entretanto apresentando organizações gênicas distintas dentre os organismos (Boore, 1999), e extremamente conservado em alguns grupos de vertebrados (Johansen *et al.*, 1990). Logo, a região controle do mtDNA D-loop normalmente é voltada à estudos populacionais (Pereira, 2000, Ferrette *et al.*, 2015; O'Leary *et al.*, 2015), dentre outras características, por manter uma taxa evolutiva entre duas e cinco vezes mais rápida que o restante do genoma mitocondrial (Meyer, 1993). Além disso, esta região fornece importantes dados genéticos, os quais, com base em seus haplótipos têm possibilitado distinções interpopulacionais de forma bastante satisfatória (Patarnello *et al.* 2003, Perdices *et al.* 2004), permitindo inferências de relações entre táxons próximos estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura populacional (Avice, 1994).

Especificamente em peixes, estudos filogeográficos têm sido realizados em sua maioria nas regiões que englobam os Estados Unidos e Europa (Beheregaray, 2008). Na região neotropical, apesar de englobar aproximadamente $\frac{1}{4}$ das espécies de peixes continentais do mundo (Schaefer, 1998), pouco ainda conhecemos acerca dos padrões que determinaram a distribuição espacial e temporal destas espécies, tampouco os eventos históricos que culminaram na extraordinária diversificação existente nesta região (Montoya-Burgos, 2003). Logo, tanto em nível intra como interespecífico, a ictiofauna neotropical é reconhecidamente um importante ambiente para testar hipóteses de biogeografia histórica (Vari e Weitzman, 1990).

Nesse sentido, o gênero *Astyanax* é reportado como o mais diversificado dentre os Characidae neotropicais (Lucena *et al.*, 2013), formado por aproximadamente 147 espécies, das quais 34 somente na última década (Rossini *et al.*, 2016), distribuídas ao longo da maioria das bacias hidrográficas brasileiras (Garutti e Britski, 2000; Lima *et al.*, 2003; Vari e Castro, 2007). Adicionalmente, as espécies pertencentes a este grupo apresentam uma diversidade acentuada de seu número diploide: entre 36 e 50 cromossomos (Moreira-Filho *et al.*, 2001), além da presença de cromossomos B, reportados em pelo menos 12 espécies deste grupo (cap. 1), e definidos como elementos adicionais ao conjunto de cromossomos autossômicos (Houben *et al.*, 2013), e têm como características, dentre outras, não apresentar herança mendeliana; podem variar numérica e morfológicamente de forma inter e intraindividualmente entre espécies e populações portadoras; não se recombina com cromossomos do conjunto padrão; sua origem é controversa dentre os organismos (Douglas e Birchler, 2017).

Assim, apesar de espécies de *Astyanax* serem reportadas em praticamente todos os ambientes de águas continentais, apenas uma parcela delas apresentam cromossomos B em seu genoma, e desta, na maioria das vezes apenas em algumas populações (vide

tabela 1; figura 1), onde *A. bockmanni* têm tido destaque por apresentar três morfotipos de cromossomos B em seu genoma (B_M , B_a e B_m), além de significativa instabilidade mitótica destes elementos, inclusive mosaicismo (Daniel *et al.*, 2012). Dessa forma, utilizamos sequências nucleotídicas da região controle do mtDNA para avaliar possíveis especificidades genéticas entre populações de *A. bockmanni* portadoras e não portadoras de supranumerários.

Material e métodos

Amostragem

Ao todo, foram amostrados 184 exemplares de *A. bockmanni*, provenientes de 16 populações, distribuídas ao longo de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (tabela 2; figura complementar 1). 74 destes exemplares correspondem a tecidos doados pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBB) – IBB - Unesp Botucatu. Os 110 exemplares restantes foram amostrados, identificados, e posteriormente catalogados, encontrando-se depositados em na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes - LaGenPe, Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, Unesp/Bauru.

Todas as coletas foram realizadas em acordo aos órgãos MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO – 18884-1, com registro no IBAMA nº 2567470.

Tabela 2: populações de *Astyanax bockmanni* utilizadas na amplificação e posterior sequenciamento da região controle mtDNA.

Espécie	N	Latitude/Longitude	Identificação da localidade	Drenagem	Município/Estado
<i>Astyanax bockmanni</i>	07	S 23°01'27.4" W 48°49'41.0"	Rio Novo	Rio Paraná	Avaré/SP
<i>A. bockmanni</i>	07	S 22°27'02.2" W 49°14'26.8"	Rio Água Doce	Ribeira de Iguape/Atlântico	Tapiraí/SP
<i>A. bockmanni</i>	06	S 23°56'17.9" W 50°43'44.5"	Córrego Lambari	Rio Paranapanema/Bacia do Prata	Sapopema/PR

<i>A. bockmanni</i>	07	S 23°45'01.2" W 46°09'52.9"	Rio Itatinga	Atlântico	Bertioga/SP
<i>A. bockmanni</i>	07	S 18°55'13.1" W 52°02'40.0"	Riacho sem nome	Rio Paraná	Aporé/GO
<i>A. bockmanni</i>	07	S 19°39'53.7" W 47°49'04.4"	afluente do Rio Uberaba	Rio Paraná	Uberaba/MG
<i>A. bockmanni</i>	07	S 23°11'28.0" W 50°56'45.0"	afluente do Rio Tibagi	Rio Tibagi/Paranapanema	Jataizinho/PR
<i>A. bockmanni</i>	08	S 22°53'54.0" W 48°23'20.0"	Rio Capivara	Rio Tietê	Botucatu, SP
<i>A. bockmanni</i>	11	S 22°59'24.0" W 48°25'36.0"	Ribeirão Água da Madalena	Rio Paranapanema	Botucatu/SP
<i>A. bockmanni</i>	06	S 18°43'14.6" W 44°20'47.3"	Córrego Amendoim	Rio das Velhas/Rio São Francisco	Curvelo/MG
<i>A. bockmanni</i>	23	S 22°45'3.11" W 49°22'80.17"	Rio Alambari	Rio Turvo/Paranapanema	Brasília Pta./Cabrália Pta./SP
<i>A. bockmanni</i>	29	S 22°6'40.92" W 49°16'5.81"	Rio Batalha	Rio Batalha/Tietê	Bauru/Piratininga/SP
<i>A. bockmanni</i>	16	S 22°23'8.35" W 49°55'63"	Córrego Campo Novo	Rio Batalha/Rio Tietê	Agudos/Bauru/SP
<i>A. bockmanni</i>	14	S 22°27'6.12" W 48°53'44.34"	Córrego Barra Seca	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Bauru/Pederneiras/SP
<i>A. bockmanni</i>	16	S 22°34'55.1" W 49°24'14.4"	Córrego Jararaca	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Paulistânia/SP
<i>A. bockmanni</i>	13	S 22°34'26.6" W 49°24'15.4"	Riacho sem nome	Rio Turvo/Rio Paranapanema	Espírito Sto do Turvo/SP

O DNA genômico total foi isolado com o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega” de acordo com as orientações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi observada em um transluminador sob luz ultravioleta (UV) por meio de gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA (0,015 µL/mL). Após verificar sua integridade, as amostras foram quantificadas em um Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Reação de amplificação, purificação e sequenciamento do mtDNA D-loop

O fragmento mtDNA D-loop foi amplificado via *Polimerase Chain Reaction* (PCR) com base nos *primers* H16498 5'-CACCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M 5'-ACATGAATTGGAGGTATACCAGT-3' (Prioli *et al.*, 2002) em todos os 184 exemplares amostrados. Os padrões da reação foram: Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 plus 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 2,5 µM de cada primer;

0,1 mM de cada dNTP; 2,5 U *Taq*-polymerase (Applied Biosystems), 15 ng total DNA; água para completar um volume final de 12 µL. Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 35 ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 2'; desnaturação a 94°C por 30"; anelamento a 56°C por 30"; extensão de 7' a 72°C, seguida de manutenção de a 12°C.

Após a reação de PCR, as amostras foram purificadas por meio da enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation). Para isto, 5 µL do produto amplificados foram adicionados em um microtubo (0,2 mL) e posteriormente adicionado 2,0 µL da solução de purificação (0,13 µL de ExoSap + 1,87 µL de água ultrapura). Após estas etapas as amostras foram levadas à um termociclador por 1h a 37°C seguida de 15' à 80°C. A placa de sequenciamento foi preparada utilizando-se o Kit "Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente foi efetuado uma nova purificação com EDTA/acetato de sódio/etanol: 0,7 µL de EDTA (125mM) e 0,7 µL de acetato de sódio (3M) a cada amostra; 17,5 µL etanol 100% para posterior incubação por 15' em T°C ambiente; centrifugou-se por 75' a 3.500 rpm, descartando o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 24,5 µL de etanol 70% gelado, centrifugado por 18' à 3.500 rpm, e retirado o sobrenadante; por último as amostras foram levadas à um termociclador por 8' a 96°C para completa evaporação do etanol. Por fim, as amostras foram então ressuspendidas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5' e submetidas a um sequenciador automático ABI 3730 XL Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California).

Análise das sequências mtDNA

Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento do fragmento mtDNA D-loop e sua edição foram conduzidos no programa Geneious v.4.8.5 (Kearse *et al.*, 2012), com base no sistema *Muscle Alignment*. A identidade das sequências foi confirmada no

algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando-se como referência o genoma mitocondrial completo de *A. paranae* (Silva *et al.*, 2016b), além de sequências parciais mtDNA D-loop de *A. bifasciatus* (Tschá *et al.*, 2017) e *A. altiparanae* (Prioli *et al.*, 2002). Em seguida, as sequências foram submetidas ao teste de saturação de Xia (Xia *et al.*, 2003; Xia e Lemey, 2009) no programa DAMBE v.6 (Xia, 2017) e posteriormente alinhadas entre si gerando os arquivos *consensu* utilizados para a elaboração dos testes estatísticos necessários.

A composição nucleotídica, sítios polimórficos e diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram computados nos programas Geneious v.4.8.5 e DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) (Rozas *et al.*, 2003), e a diversidade haplotípica calculada no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005). A diferenciação genética entre as populações foi feita pelo teste estatístico F (Wright, 1949; 1965), onde valores Φ_{ST} entre 0 e 0,05 indicando baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15 estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25 alta estruturação; acima de 0,25 forte estruturação genética.

A heterogeneidade genética entre os haplótipos foi verificada no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3, associado à estatística F de Wright (1949, 1965) pelo teste de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997) também foram executados no programa ARLEQUIN 3.5.1.3. Todos arquivos de saída do tipo .txt gerados foram observados no programa Notepad++ v.7.5.3 (Shum, 2013). Já os gráficos criados no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 foram observados no programa GIMP v.2.9.4 (www.gimp.org).

As redes haplotípicas foram construídas no programa popART (Leigh e Bryant, 2015), e os dendogramas no programa FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) pelo algoritmo *Median-joining*. O teste de

isolamento por distância foi conduzido utilizando $F_{st}/(1-F_{st})$ (Rousset, 1997) e a distância geográfica pelo teste de Mantel (Mantel, 1967) no programa ARLEQUIN v.3.5.1.3 associado ao programa R (<https://www.r-project.org>), considerando-se 10.100 permutações.

Resultados

A partir do sequenciamento mtDNA D-loop observamos uma diversidade nucleotídica que apresentou índices desde $\pi = 0.00325$ (Água da Madalena) a $\pi = 0.08343$ (Cativara) (Tabela 3), com uma composição nucleotídica média de 32.8% para Adenina, 12.8% de Citosina, 17.1% de Guanina e 37.4% para Timina. Adicionalmente 151 haplótipos foram obtidos dentre os 184 exemplares analisados, os quais apresentaram uma diversidade haplotípica total $H_d = 0.9854$, que oscilou desde $h = 0.714$ (Uberaba) a $h = 1,000$ (Amendoim, Água Doce, Itatinga, córrego sem nome/Aporé, Barra Seca e Novo).

Entre os haplótipos mais compartilhados, têm destaque Hap_78 (compartilhado entre 14 indivíduos), Hap_79 (compartilhado entre 11 exemplares), Hap_106 (presente em 8 exemplares), Hap_25 (6 indivíduos) e Hap_41 (5 exemplares). Adicionalmente, nenhum haplótipo foi reportado em todos os indivíduos de uma população. Nesse sentido, a partir do elevado número de haplótipos apresentado, três redes haplotípicas foram construídas. Na primeira rede haplotípica (feita com base em todas as 16 populações amostradas) observamos que há um compartilhamento maior de haplótipos entre exemplares das localidades Batalha e Campo Novo, seguida de Alambari, Água da Madalena, populações localizadas na Bacia do Tietê e Paranapanema, respectivamente.

Tabela 3: Diversidade genética observada entre as populações de *A. bockmanni* a partir da análise de mtDNA D-loop.

População	N	Nh	h	π
¹ Amendoim	6	6	1,000	0,02985
² Água Doce	7	7	1,000	0,03412
¹ Lambari	6	5	0,933	0,01398
² Itatinga	7	7	1,000	0,07015
¹ Jararaca	16	14	0,983	0,07232
⁴ Sem nome (Aporé/GO)	7	7	1,000	0,03898
² Tibagi (Jataizinho/PR)	7	5	0,905	0,04041
¹ Sem nome (Paulistânia/SP)	13	11	0,974	0,03392
² Uberaba	7	4	0,714	0,01721
² Capivara	11	8	0,927	0,08343
³ Água da Madalena	8	5	0,893	0,00325
² Batalha	29	9	0,759	0,07166
² Alambari	23	17	0,960	0,05387
¹ Campo Novo	16	9	0,817	0,00375
¹ Barra Seca	14	14	1,000	0,05916
² Novo	7	7	1,000	0,00685

N = número de indivíduos, Nh = número de haplótipos, h = diversidade haplotípica;
 π = diversidade nucleotídica. ¹córrego; ²rio; ³ribeirão; ⁴riacho.

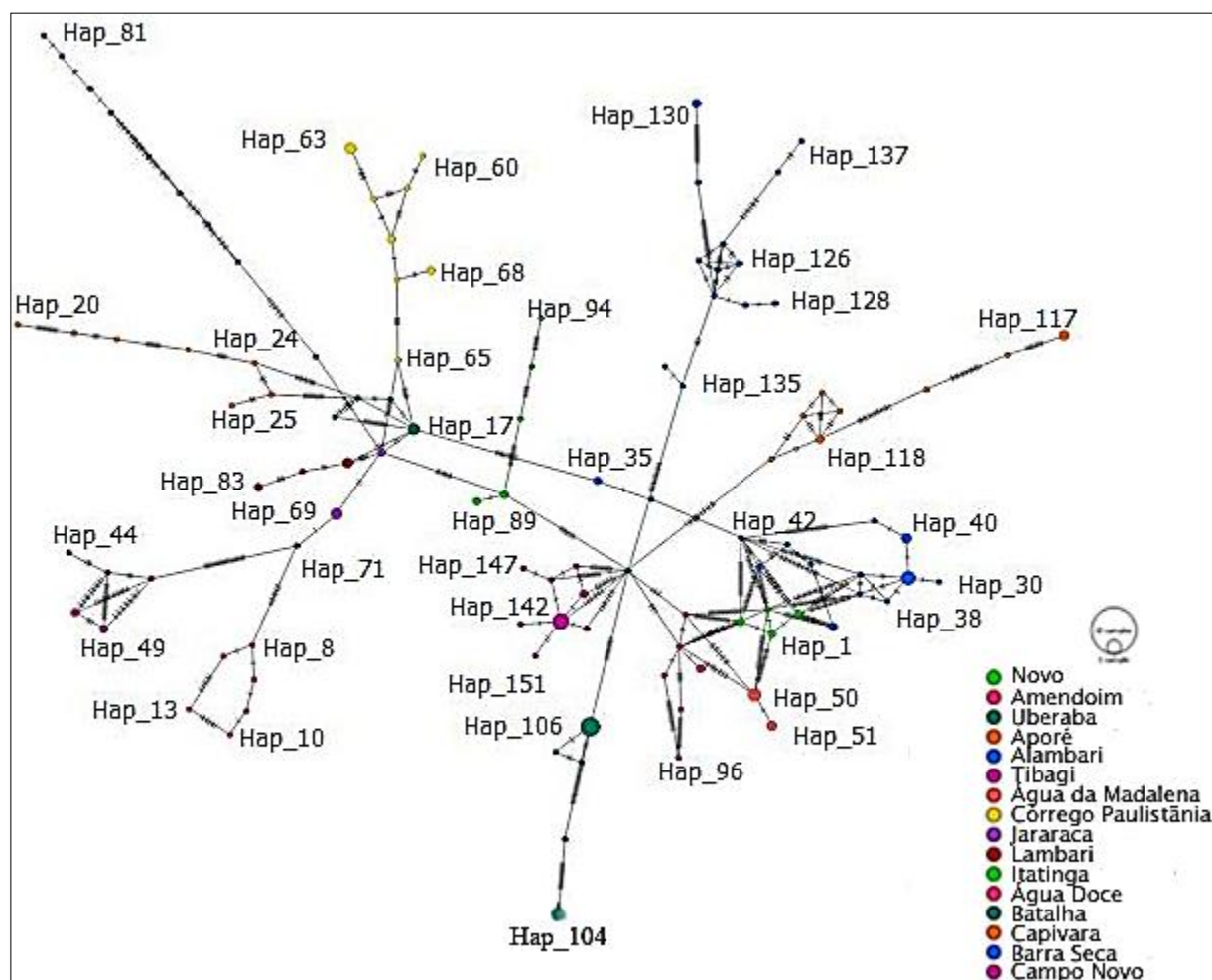


Figura 6: Rede haplotípica gerada a partir de dados de mtDNA D-loop entre todas as populações de *A. bockmanni* amostradas.

Em um segundo momento a rede haplotípica foi feita distribuindo as populações de acordo com suas bacias e sub-bacias hidrográficas. Assim, 5 grupos foram formados, nomeados como Atlântico, Grande_Paranaíba, Tietê, Paraná_Paranapanema e São Francisco. Os resultados indicam um maior compartilhamento de haplótipos entre exemplares pertencentes à bacia do Tietê, destacando-se os Hap_104, Hap_97 e Hap_141 (figura 7).

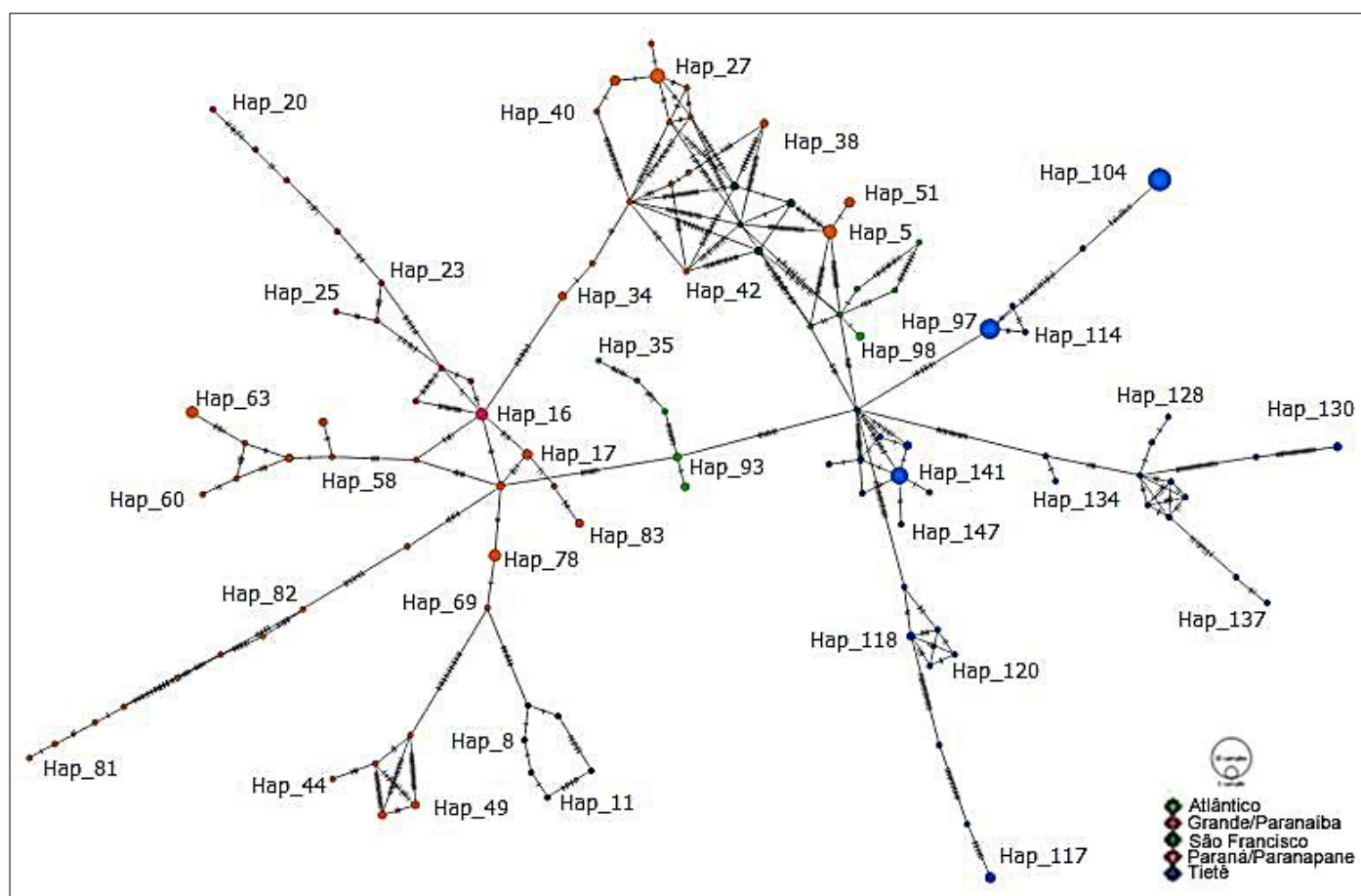


Figura 7: Rede haplotípica criada a partir de dados mitocondriais da região controle entre grupos divididos de acordo com suas respectivas bacias hidrográficas.

Em seguida foi elaborado uma terceira rede haplotípica, a qual aborda apenas as populações portadoras de cromossomos B. Após análise, foi verificado uma concentração de haplótipos na população Batalha (Hap_20 e Hap_21). De forma contrária, a população Jararaca foi a que menos apresentou compartilhamento haplotípico, exibindo um padrão de haplótipos individualizados entre seus exemplares (figura 8).

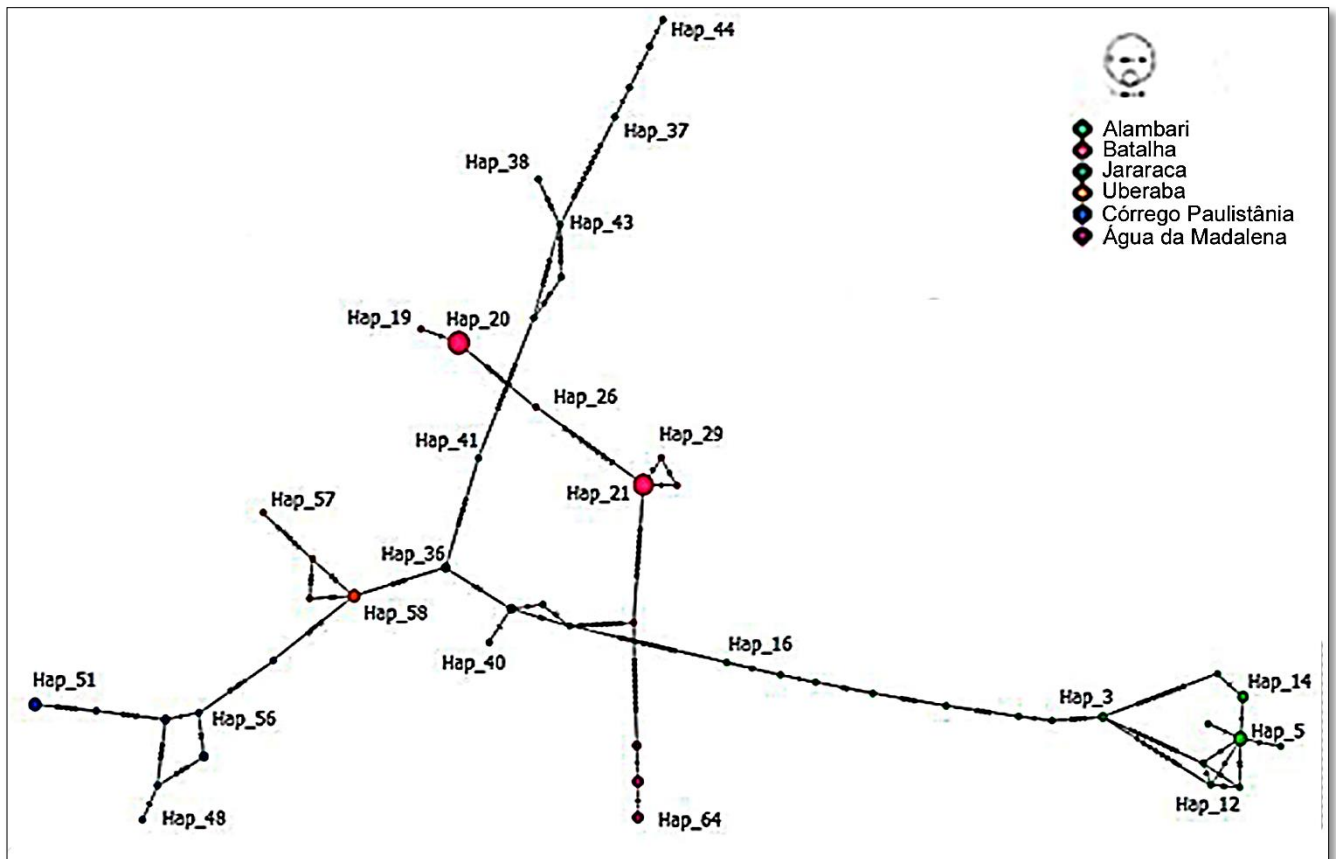


Figura 8: Rede haplotípica gerada com base no mtDNA D-loop das populações de *A. bockmanni* portadoras de cromossomos B.

Em relação ao índice de fixação interpopulacional Φ_{ST} , observamos valores desde 0.55396 (Uberaba x Jararaca) a 0.96694 (Novo x Água da Madalena) (tabela complementar 3), indicando diferenças significativas entre todas as populações (figura 9). Quando executado o Φ_{ST} aos grupos, verificamos um valor de 0.18085 entre os grupos Paraná_Paranapanema x São Francisco e de 0.39510 entre os grupos Grande_Paranaíba x Tietê (tabela complementar 4). Além disso, diferenças significativas também são observadas entre os demais grupos analisados, conforme representado na figura 10.

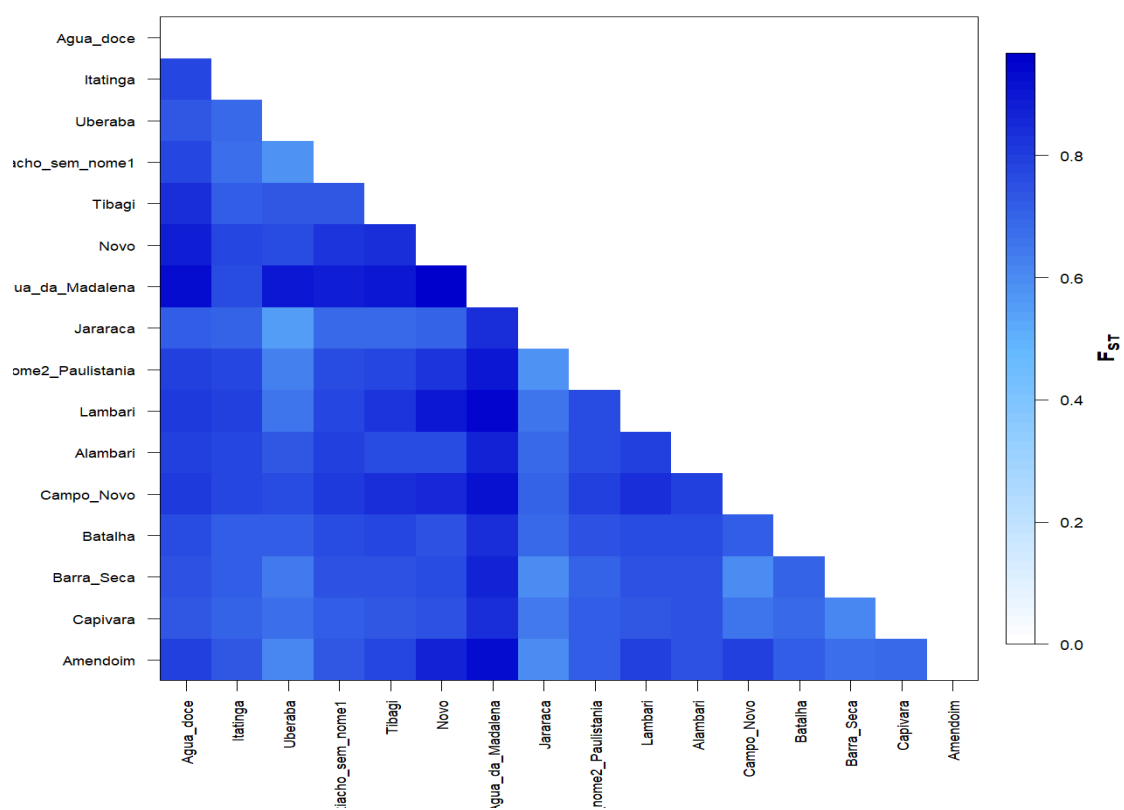


Figura 9: Matriz de distância entre as populações com base nos valores Φ_{ST} .

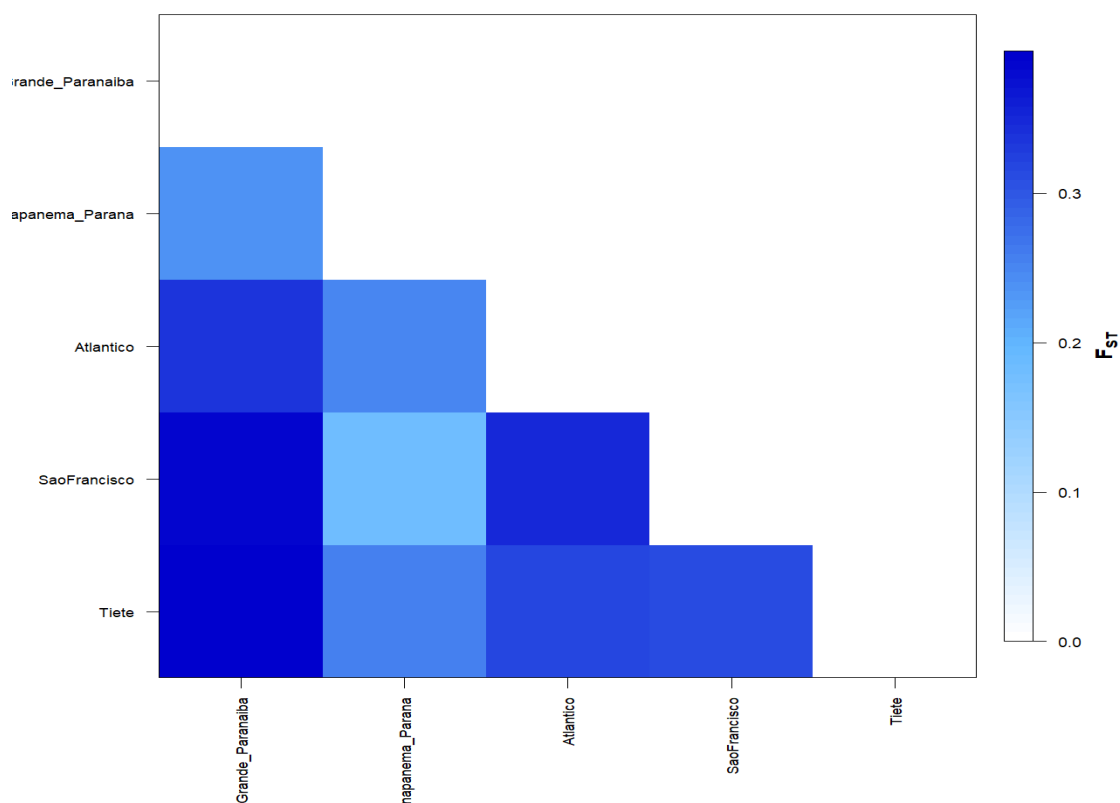


Figura 10: Matriz de distância entre as populações com base nos valores Φ_{ST} .

Os testes D de Tajima e Fs de Fu indicam que não há evidência de expansão populacional entre as populações analisadas (tabela complementar 5). O resultado do teste de isolamento por distância (teste de Mantel com 10.000 permutações) efetuado para todas as 16 populações de *A. bockmanni* não se mostrou estatisticamente significativo ($r = -0.084167$ e $P = 0.631800$). Posteriormente o mesmo teste foi efetuado aos grupos, divididos de acordo com as bacias hidrográficas, o qual apresentou valores $r = -0.111693$ e $P = 0.606300$, e da mesma forma não se mostrou significativo (tabela complementar 6).

Em relação a análise de variância molecular (AMOVA) a análise entre todas as 16 localidades como um único grupo hierárquico indicou que existe uma diferenciação intermediária, com valor para $\Phi_{ST} = 0.75755$, e maior variabilidade genética entre populações (75.75%) do que dentro das localidades (24.25%) (tabela complementar 7; figura 11). Após, foi feita a análise de variância agrupando-se as populações de acordo com sua localidade (i.e, todas populações pertencentes a uma mesma bacia foram direcionadas ao mesmo grupo). Os resultados deste agrupamento indicaram uma variabilidade genética de 7.63% entre os grupos, 68.66% entre as populações e 23.71% dentro das populações, porém não se mostrou significativo ($P = 0.5386$) (tabela complementar 8).

Por fim, foi efetuado uma análise AMOVA envolvendo apenas populações de *A. bockmanni* reportados com cromossomos B, onde os valores levantados foram de 76.20% entre populações, e de 23.80% dentro das populações (tabela complementar 9; figura 12). Todos os valores foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni, com valores de P considerados significativos.

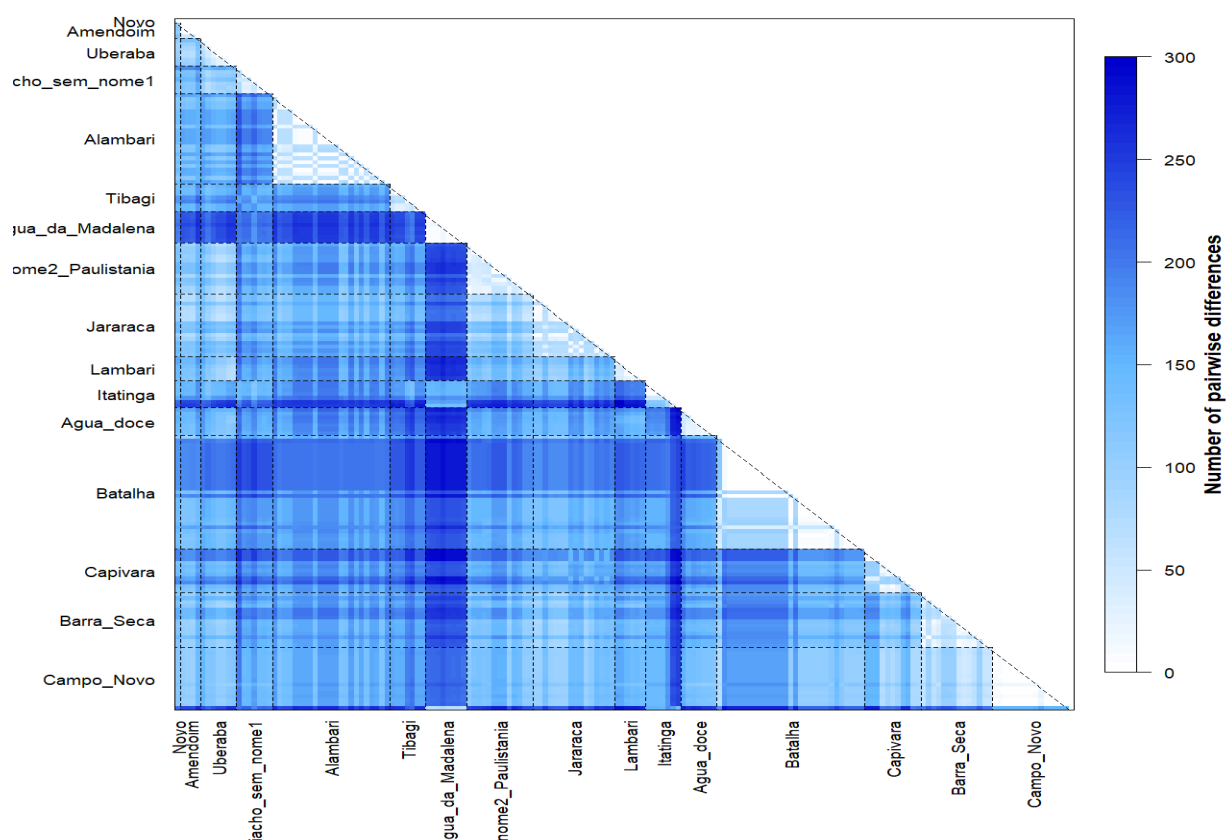


Figura 10: distância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações de acordo com com base no mtDNA D-loop.

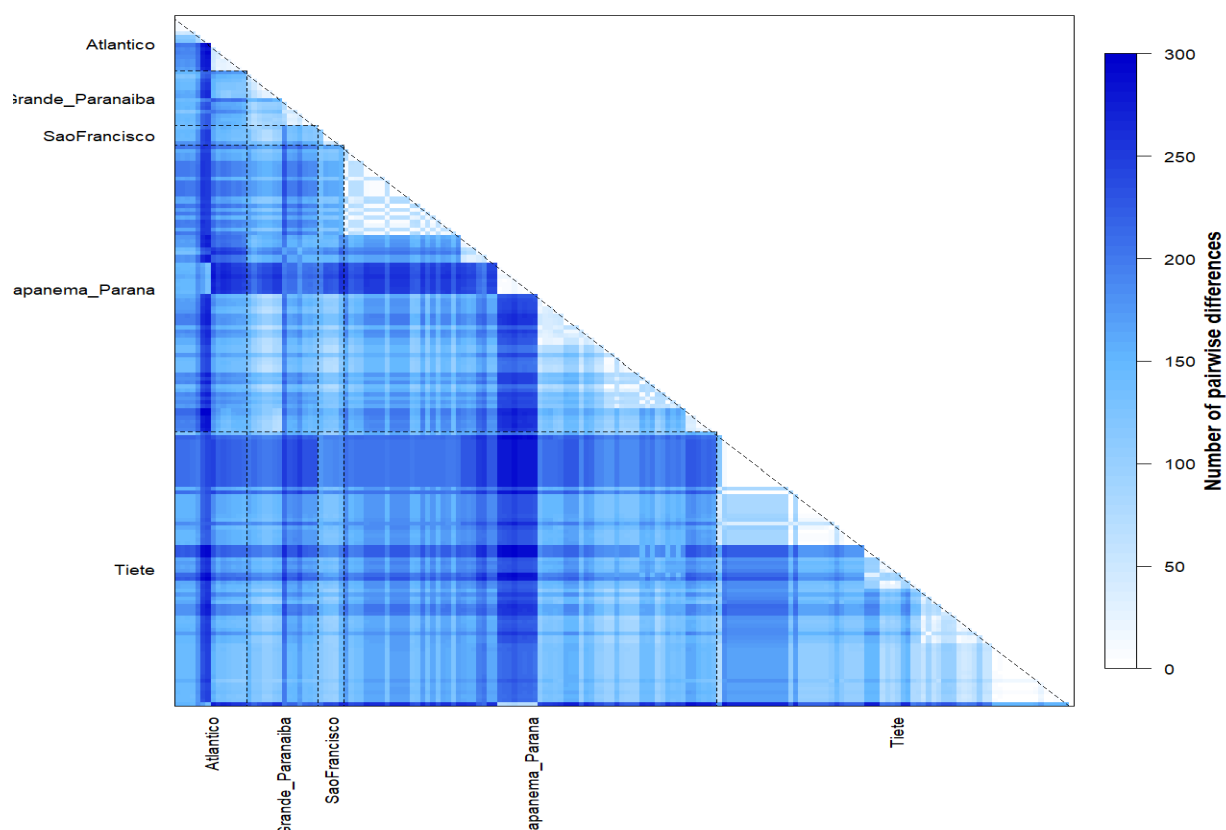


Figura 11: distância molecular (AMOVA) entre e dentro dos grupos (bacias hidrográficas) com base em dados de mtDNA D-loop.

O dendrograma construído a partir das distâncias genéticas indicou quatro grupos relacionados, entretanto com formação aparente de subgrupos: Novo-Itatinga-Batalha; Amendoim-Aporé-Alambari-Tibagi; Lambari-Uberaba-Paulistânia-Jararaca; Água da Madalena-Água Doce-Capivara-Campo Novo; e Barra Seca isolada das demais (figura 12).

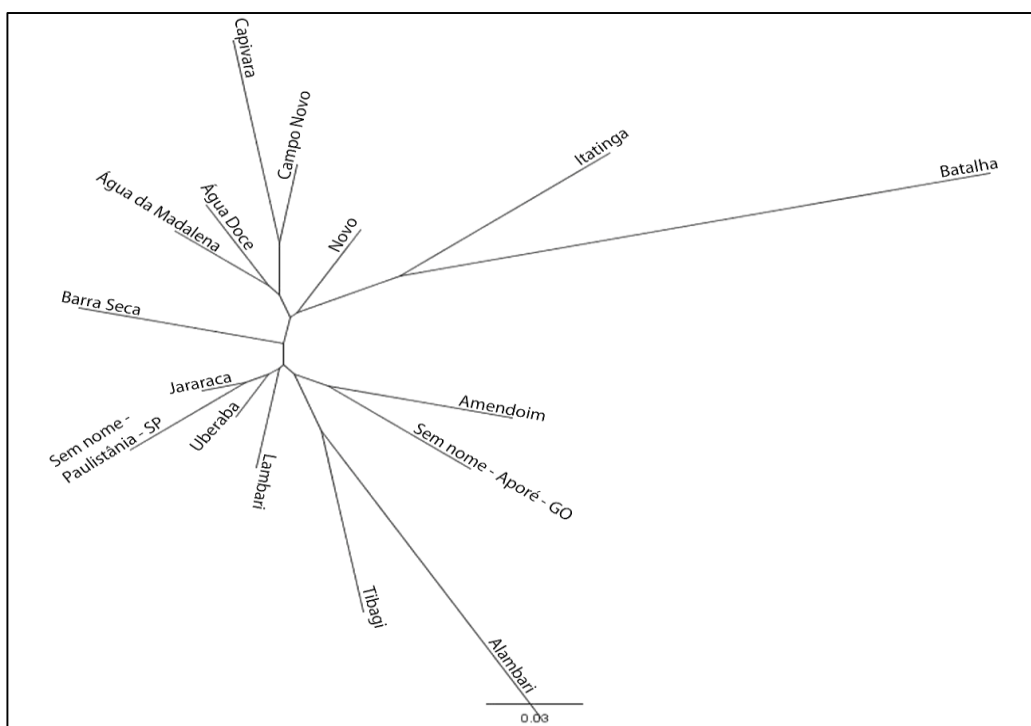


Figura 12: Dendrograma construído a partir das distâncias genéticas levantadas.

Já o dendrograma elaborado para os grupos, subdivididos de acordo com suas bacias e sub-bacias apresentou todos os grupos bem separados, com os grupos Tietê e Paraná_Paranapanema se mostrando os mais distantes dentre todos, e uma pequena aproximação entre os grupos Tietê e Grande_Paranaíba, onde ambas se encontram no mesmo ramo (figura 13). Entre as populações B+, o dendrograma sinalizou que as populações Batalha e Jararaca são as mais distantes geneticamente, com um grupo formado pelas populações Uberaba-Paulistânia-Jararaca, e as demais populações isoladas uma das outras (figura 14).

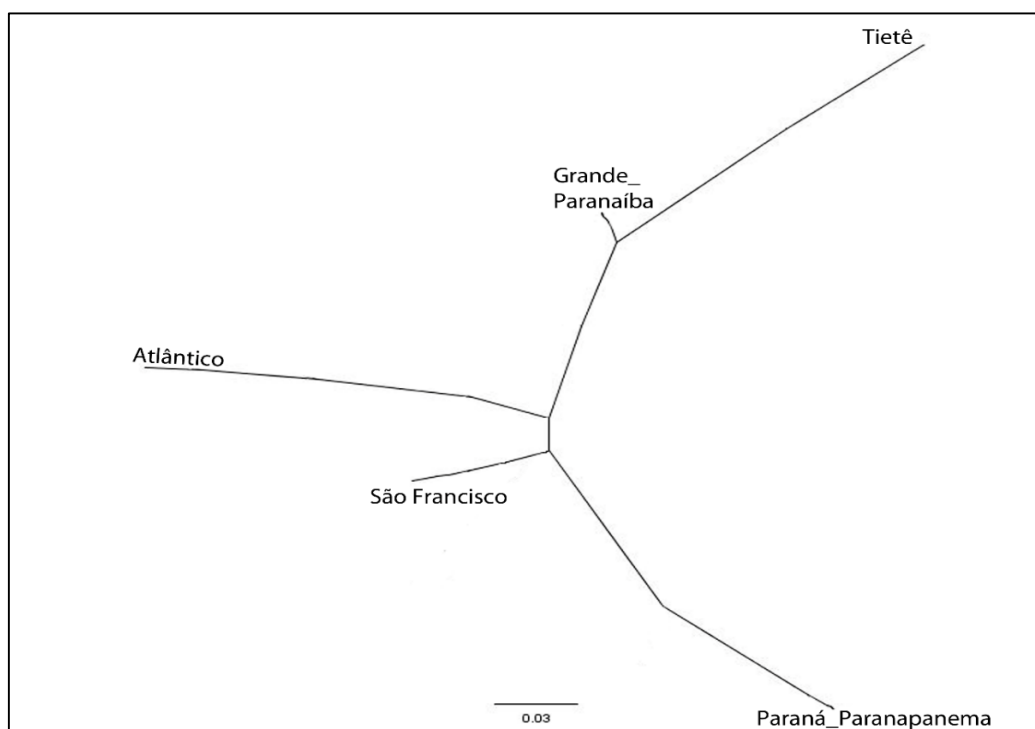


Figura 13: Dendrograma de distância genética construído de acordo com os grupos, agregados por bacias e sub-bacias.

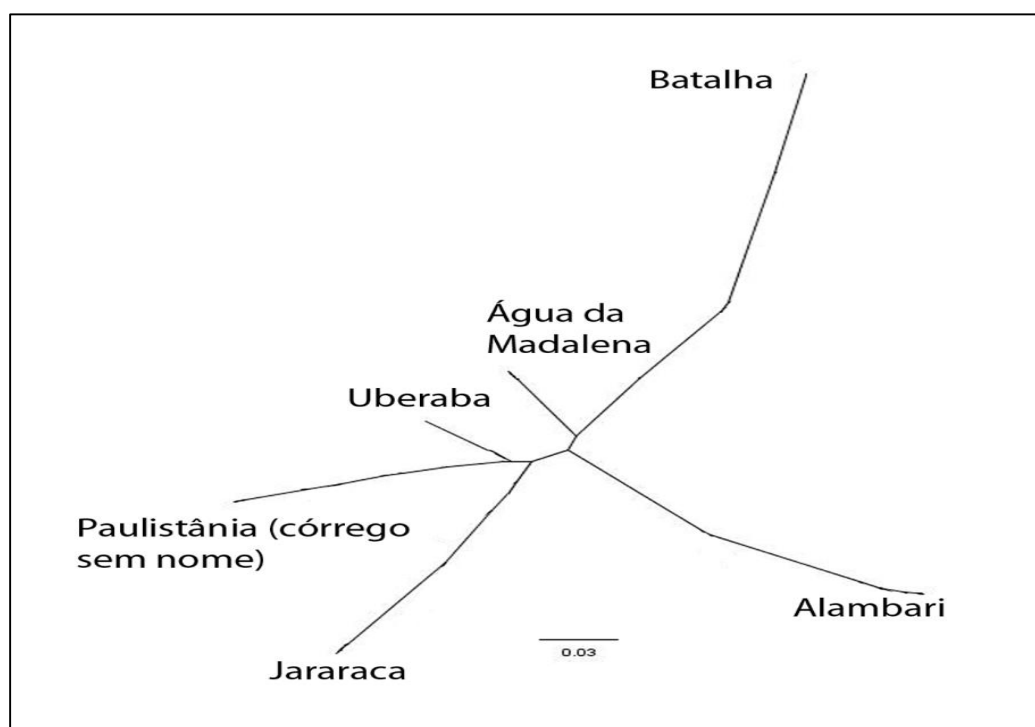


Figura 14: Dendrograma de distância genética considerando apenas as populações portadoras de cromossomos B

Mediante o considerável número de haplótipos observados, complexas redes haplotípicas foram construídas, revelando um compartilhamento maior de haplótipos entre as populações Batalha e Campo Novo, seguida de Alambari e Água da Madalena, populações da Bacia do Tietê e Paranapanema, respectivamente. Em relação a rede haplotípica entre grupos, Paraná_Paranapanema foi o que apresentou maior variedade de haplótipos. Uma alta similaridade entre haplótipos indica que eles podem ter se originado recentemente de um haplótipo ancestral comum. Por outro lado, níveis elevados de diversidade haplotípica podem sugerir um tempo maior de divergência desde o aparecimento dos primeiros haplótipos (Billington e Hebert, 1991).

Dessa forma, nossos resultados apontam para uma história populacional antiga, com um tempo de divergência maior entre as populações amostradas de *A. bockmanni*, o que também pôde ser observado nas redes haplotípicas criadas, porém devido à valores de π próximos de zero, diversas populações são consideradas geneticamente iguais. Segundo Avise (2000), a ausência de um mesmo haplótipo de mtDNA em diferentes populações revelaria ausência de fluxo gênico entre elas (ao menos via materna). Em um estudo realizado por Alves *et al.* (2007) em populações de *Prochilodus lineatus* nos principais rios da América do Sul, os autores revelaram alto nível de divergência entre os haplótipos na Bacia do Rio Paraná, propondo a ocorrência de diversas subpopulações (haplótipos divergentes em simpatria) nos rios Da Plata e Uruguai.

Somado a isso, a análise de variância molecular efetuada entre as 16 populações apresentou valores de 75.75% entre as populações e 24.25% dentro das populações, com $\Phi_{ST} = 0.75755$ ($P = 0$), revelando uma estruturação genética considerável. Já a AMOVA entre os grupos (Tietê/Paraná_Paranapanema x Grande_Paranaíba/Atlântico e São Francisco) indicaram uma variação de 23.71% dentro das populações e 68.66% entre as populações de cada grupo, com valores Φ_{ST} par a par de 0.76287 e $\Phi_{SC} = 0.74328$

(porém Φ_{SC} não foi considerado estatisticamente significativo: $P = 0.50812$), caracterizando uma estruturação genética mediante valores Φ_{ST} ($P = 0$). Somado a isso, todas as populações apresentaram $D > 0$ para o teste D de Tajima, o qual sugere redução do tamanho populacional em todas elas.

Padrões de estruturação genética também já foram reportados em *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), *Pseudoplatystoma corruscans* (Pereira *et al.*, 2010) e *Brachyplatystoma filamentosum* (Batista, 2010). Da mesma forma, Sofia *et al.* (2006) reportaram baixo fluxo gênico entre populações de *A. scabripinnis* do rio Cambé, assim como Leuzzi *et al.* (2004) analisando populações de *A. altiparanae* do rio Paranapanema. Segundo estudos dirigidos por Matsumoto e Hilsdorf (2009) em *Brycon insignis* e Barroca *et al.* (2012) em *Prochilodus costatus* e *P. argenteus* a estruturação genética de grupos selvagens de peixes continentais são fatos frequentemente evidenciados, muitas vezes influenciado por fatores geológicos e comportamentais (Allan e Flecker, 2003). Logo, aparentemente estas características também parecem ser compartilhadas entre outros grupos e espécies de *Astyanax*.

Nesse sentido, Mallet *et al.* (2005) relatam que durante os períodos glaciais, os últimos eventos possam ter contribuído para um aumento da distância interespecífica pela possibilidade de eliminação de espécies irmãs e uma menor diversidade intraespecífica causada por problemas populacionais. Além disso, De Woody e Avise (2000) propõem que populações de peixes continentais de pequeno porte são, em sua maioria, limitadas a rios, riachos e córregos por tempos evolutivos curtos a moderados, o que reduz potencialmente áreas de trocas genéticas, e consequentemente aumentando as chances de cruzamentos endogâmicos. De fato, estes tempos evolutivos foram observados em todas as populações analisadas. De acordo com o teste F_S de Fu todas as mutações mtDNA D-loop ocorridas entre estas populações seriam antigas (todas populações apresentaram

$P > 0$). Se levarmos em conta que a taxa de mutação da região controle é de 10^{-5} a 10^{-9} por locus a cada geração (Lougheed *et al.*, 2000), e que espécies de *Astyanax* podem se até quatro vezes ao ano (), isso poderia explicar os valores AMOVA refletidos entre e dentro das populações e grupos de *A. bockmanni* analisados no atual estudo.

Em um estudo similar desenvolvido por Kavalco e Moreira-Filho (2003), os autores concluíram que para a espécie *A. scabripinnis* algumas confluências de córregos e pequenos riachos com grandes rios podem funcionar como barreiras à expansão populacional, devido à elevada concorrência com outros Characidae e a presença de predadores. Já para *A. xavante*, Reis *et al.* (2015) associaram essa restrição de aumento populacional e fluxo genético unidirecional, a presença de uma queda d'água de aproximadamente 30m, a qual fazia um papel de barreira geográfica entre duas populações desta espécie. Em contrapartida, salientamos que na estruturação genética populacional medida através de análises mtDNA D-loop leva em conta apenas processos genéticos ligados às fêmeas, e não podemos generalizar estes resultados já que diferentes populações podem apresentar comportamentos biológicos geologicamente distintos ao longo da região Neotropical.

Por fim, as estimativas do índice de fixação Φ_{ST} par a par entre as populações de *A. bockmani* sustentam uma hipótese de que estes agrupamentos indicam a existência de unidades populacionais diferentes para esta espécie, o que permite rejeitar a hipótese de panmixia, o que também pode ser inferido de acordo com o dendograma elaborado de acordo com as populações intrínsecas de cada bacia/localidade. Somado a isso, os resultados obtidos a partir dos testes de Mantel para os marcadores mtDNA rejeitam uma possível hipótese de isolamento por distância. Por outro lado, o dendograma elaborado entre todas as 16 populações não necessariamente elenca as populações de acordo com suas bacias, aproximando em um mesmo ramo populações de bacias distintas (Água da

Madalena – Paranapanema e Água Doce - Atlântico), ao mesmo tempo que distancia populações pertencentes a uma mesma bacia (Barra Seca e Batalha - Tietê).

Segundo Saadi (1993), as áreas tectônicas ativas que emergiram há menos de 1.6 milhão de anos teriam distribuído a fauna ictiológica das bacias hidrográficas, principalmente as que têm alguma ligação com fontes dos rios Ribeira do Iguaçu, Paranapanema e Tietê. Dessa forma, estudos paleobiogeográficos sugerem que a diversificação de peixes até o nível de espécies antecederia o período Pleistoceno (Lundberg, 1997), sendo provável que eventos paleohidrológicos possam ter contribuído também na divergência em nível populacional. Nesse sentido, as glaciações do Pleistoceno têm sido apontadas como eventos relevantes para o estabelecimento dos padrões filogeográficos e populacionais exibidos atualmente por diversas espécies aquáticas (Mobley *et al.*, 2010). A penúltima máxima regressão marinha do Pleistoceno (marcados por grande acúmulo de água na forma de gelo) ocorreu a ~140 mil anos atrás, deixando toda a plataforma continental brasileira exposta. Evidências destes eventos parecem ter ficado registrados nas sequências nucleotídicas da região D-loop do mtDNA da espécie *Cephalopholis fulva*, e têm sido amplamente registrados na lontra *Ptenoura brasiliensis* (Pickles *et al.*, 2010), e da mesma forma, pode ser o que está sendo refletido na espécie *A. bockmanni* analisada neste estudo.

Portanto, acreditamos que as disparidades dos valores observados de mtDNA D-loop, somado à diversos fatores nas populações nos permite inferir que a espécie *A. bockmanni* possa na verdade englobar um complexo de espécies, assim como já proposto para as espécies *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2004), *A. fasciatus* (Artoni *et al.*, 2006), *A. bimaculatus* (Garutti e Langeani, 2009) e *A. hastatus* (Kavalco *et al.*, 2009) com base em caracteres morfológicos, cromossômicos e moleculares. Somado a isso, nossa hipótese é fortalecida

por diversos trabalhos que têm indicando diferenças significativas entre populações de *A. bockmanni*, principalmente no tocante à presença de citótipos, polimorfismos de NORs, heterocromatina constitutiva, elementos transponíveis, rDNA, hisDNA e satDNA (Kavalco *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012, 2015a,b; Silva *et al.*, 2014, 2015).

Estudos moleculares em populações de A. bockmanni portadoras de cromossomos B

Dentre todas populações de *A. bockmanni* abordadas neste estudo, apenas seis foram diagnosticadas com cromossomos B: Batalha (B_M), Água da Madalena (B_M), Uberaba (B_M), Jararaca (B_M , B_m e B_a), Alambari (B_M , B_m e B_a) e Paulistânia (B_M e B_a). Camacho *et al.* (2000) sugerem que a variação na forma, tamanho e frequência de cromossomos B entre populações dependeria, a grosso modo, da ação simultânea de quatro fatores: fatores seletivos (i.e. poder de uma espécie em suportar uma carga genética/cromossômica adicional), históricos (número de gerações após a origem do supranumerário), fatores de transmissão (intensidade de acúmulo de cada variante de B), e aleatórios (ação da deriva genética e populações consideravelmente reduzidas). No caso das populações B+ de *A. bockmanni* reportadas neste estudo pouco ainda sabemos sobre a ação destes fatores acerca da origem, manutenção ou transmissão dessa classe cromossômica.

Em relação às diferentes formas e tamanhos de supranumerários observados entre as populações de *A. bockmanni*, o fator histórico, aparentemente é o que possa ter maior influência. Assim, partindo-se desta premissa, algumas informações reforçam esta hipótese: todas as populações de *A. bockmanni* portadoras de cromossomos B, detêm a forma e tamanho B_M , porém nem todas mantêm outras formas ou tamanhos (por ex: B_m e B_a); cromossomos B somente são reportados nas bacias do Paraná_Paranapanema e

Tietê, esta última inferida via qPCR. Segundo Moreira-Filho *et al.* (2004), provavelmente a variante B_M corresponda a um cromossomo B ancestral no gênero. Além disso, para algumas espécies do gênero há evidências que sugerem que o cromossomo B_M é um isocromossomo (Vicente *et al.*, 1996; Vicari *et al.*, 2011 Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014, 2016). As demais variantes (B_m e B_a em *A. bockmanni*) seriam fruto de rearranjos estruturais do cromossomo B_M (Fernandes e Martins-Santos, 2005).

Segundo Zurita *et al.* (1998), o ciclo de vida dos cromossomos B compreende três fases: invasão, neutralização e extinção (para maiores detalhes vide figura 1). Na fase neutra os supranumerários devem sofrer mutações em suas sequências para originar uma nova variante, caso contrário seriam destinados à extinção. Nesse sentido, levantamos a hipótese de que o cromossomo B de *A. bockmanni* possa ter se originado na bacia Paraná_Paranapanema, pois é a única que apresenta outras variantes de supranumerários que não apenas B_M. Dessa forma, o supranumerário desta bacia apresentaria um maior tempo evolutivo, e consequentemente, poderia acarretar em outras variantes, observadas apenas nas populações Alambari, Jararaca e Paulistânia (B_M, B_m e B_a). Em um estudo desenvolvido por Cabrero *et al.* (2013) os autores registraram a ocorrência de diversas “novas” variantes de cromossomos B no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. De acordo com López-León *et al.* (1994), a frequente geração de novas variantes de B reforça ainda mais a ideia de que o polimorfismo destes elementos genômicos é uma característica bastante comum entre seus portadores.

Douglas e Bicher (2017) postulam que devido à natureza prejudicial da maioria dos cromossomos B, altos números de suas cópias provavelmente levaria à sua extinção. Nesse sentido, muitos cromossomos B evoluíram através de mecanismos que lhes permitiram um acúmulo a fim de serem herdados a taxas maiores do que as esperadas, ou seja, não obedecendo as leis de transmissão mendeliana. Para este tipo de mecanismo é

referido o nome de *drive* (Houben, 2017). De acordo com Camacho *et al.*, (1997), o acúmulo de cromossomos B pode proporcionar um marcante aumento de sua frequência em uma determinada população em um período de apenas dez gerações. Porém, como tratam-se de elementos dispensáveis, tenderiam a uma taxa mutacional mais acentuada, e maior probabilidade a originar novas variantes, assim como apresentado para as populações de *A. bockmanni* representadas nestes estudo, onde há a presença de morfotipos de cromossomos B. Além disso, cada variante de cromossomo B apresenta seu próprio mecanismo de *drive*, aumentando assim a média de B por indivíduo ao longo do tempo (Camacho *et al.*, 1997), tal como observado nas populações com incidência apenas de uma variante de cromossomos (B_M).

Adicionalmente, de acordo com a matriz de distância genética, a população Batalha apresentou distâncias genéticas significativas das demais (média de 0.75040), porém os maiores valores são reportados entre as populações Água da Madalena x Paulistânia (0.89766). Por outro lado, em relação à variabilidade haplotípica, a população Batalha apresentou $h = 0.759$, considerada ligeiramente mais baixa que as demais. Esses valores se justificam na rede haplotípica desenhada apenas para as populações B^+ de *A. bockmanni*, onde claramente se pode observar diversos indivíduos compartilhando um mesmo haplótipo. Já a população Jararaca foi a que apresentou maior valor de variabilidade ($h = 0.983$), seguida das populações Paulistânia ($h = 0.974$) e Alambari $h = 0.960$). O dendograma elaborado de acordo com as distâncias genéticas reforçou a distância genética previamente registradas entre a população Batalha das demais populações, alocando-a relativamente mais distante das demais. Isso poderia ser um indício de que o cromossomo B_M presente nesta população poderia se tratar na verdade de um evento isolado e independente das demais populações, as quais são todas pertencentes à bacia do Paraná_Paranapanema.

De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA) aplicada às populações B+, valores de 76.20% foram observados entre as populações, e 23.80% dentro das populações, com $\Phi_{ST} = 0.76196$ ($P = 0$). Isso indica que de fato há baixo fluxo gênico entre as populações B+, assim como entre as demais populações B- analisadas no atual estudo, porém, este evento não pode ser associado a isolamento por distância, uma vez que o teste de Mantel rejeita esta hipótese. Porém, não se sabe ao certo os reais motivos de um baixo fluxo genético entre as populações de *A. bockmanni*, uma vez que em alguns casos, elas encontram-se geograficamente muito próximas, e estudos posteriores possam ser mais conclusivos acerca deste tópico. Por fim, apesar dos dados levantados, nossos resultados não nos permite diferenciar geneticamente de forma efetiva populações de *A. bockmanni* apenas pela presença ou ausência de cromossomos B. Por outro lado, este é o primeiro trabalho populacional com base em mtDNA D-loop envolvendo a espécie *A. bockmanni*, e da mesma forma, o primeiro envolvendo genética populacional associada à cromossomos B. Assim sendo, fornecemos informações interessantes desta espécie, as quais podem auxiliar na condução de outros estudos voltados a um maior conhecimento populacional de peixes, em especial as que compõe o gênero *Astyanax*.

Referências bibliográficas

A bibliografia correspondente a este capítulo encontra-se no tópico “Referências bibliográficas” ao final desta tese.

*CONSIDERAÇÕES
FINAIS*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma generalizada, os peixes têm recebido grande atenção em estudos envolvendo cromossomos supranumerários. No entanto, muitos estudos têm buscado atribuir uma função, investigar a estrutura, origem e transmissão desses elementos nos mais diversos genomas, e apesar de restrito à poucas espécies, temos avançado no conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular e estrutural dos cromossomos B em peixes, inclusive em espécies que compõem o gênero *Astyanax*. Por outro lado, ainda carecemos de diversas informações “básicas” envolvendo supranumerários. Especificamente envolvendo o gênero em questão, há diversas populações de diferentes espécies que são portadoras destes elementos adicionais, cada qual com sua(s) peculiaridade(s), porém, a maioria destas informações muitas vezes se encontram fragmentadas ou ainda dispersa. Assim, contextualizamos estas informações através de artigos disponíveis na literatura, elencando e atualizando estes dados acerca das modernas práticas tecnológicas que vêm sendo empregadas a fim de gerar um maior conhecimento dos supranumerários de *Astyanax*.

A modelagem de distribuição preditiva se mostrou estatisticamente efetiva ao objetivo em que foi submetida: mapear populações B+ e B-, projetando seus ambientes preferenciais em diferentes cenários de acordo com fatores bióticos e abióticos. Portanto, se pudermos prever impactos futuros decorrentes de mudanças climáticas em ambientes aquáticos diversos, antes precisamos alcançar uma melhor compreensão da aplicação de diferentes modelos de projeção. Desenvolver um quadro teórico mais unificado é uma tarefa extremamente desafiadora, e a integração de ideias e respostas que podem ser escalonadas, incluindo ecossistemas inteiros, parece representar um caminho potencialmente promissor, entretanto, esta metodologia deve ser aplicada com

cautela. Seu propósito deve ser mais focado na aquisição de informações sobre a ocorrência da espécie para que outras técnicas complementares possam ser aplicadas. Logo, acreditamos que na medida em que mais pesquisadores se debruçarem sobre o tema, seu desenvolvimento poderá ser bem mais aprimorado.

Além disso, ao que a modelagem indica, a partir dos dias atuais até 2060, populações de *Astyanax* com cromossomos B tenderão a se concentrar em regiões serranas, caracterizadas por climas amenos e ambientes relativamente conservados, ou seja, menos agredidos direta ou indiretamente por ações antrópicas e mudanças climáticas. Dessa forma, se pudermos através da modelagem de nicho preferencial projetar locais específicos para estudos diversos, certamente reduziríamos esforços na busca de populações que porventura possam deter as informações alvo da pesquisa, uma vez que atualmente primeiro amostramos os espécimes, depois verificamos seu conteúdo morfológico e citogenético. Logo, a partir da modelagem de nicho preferencial, poderíamos direcionar as coletas de acordo com o tipo de abordagem do estudo.

Mediante aplicação da qPCR com um marcador B_M-específico (previamente validado) em todos os indivíduos amostrados pudemos quantificar a expressão de forma significativa em cromossomos B_M de *A. bockmanni*, revelando a presença destes elementos em populações até então desconhecidas. Adicionalmente, constatamos que os cromossomos B_M de *A. bockmanni* não são tão inertes quanto se acreditava até pouco tempo, o que servirá de subsídio para o entendimento do papel desempenhado pelos cromossomos B no genoma dos peixes e, de modo mais amplo, nos vertebrados, já que a proteína NUSAP desempenha um papel de suma importância relacionada aos microtúbulos do fuso mitótico.

De acordo com a literatura, trabalhos que se utilizaram de análises moleculares para interpretar a história filogenética de peixes neotropicais, embora em baixo número comparado à gama de espécies válidas, reforçam a ideia de que a taxonomia dos peixes continentais dessa região pode se equivocar no tocante aos relacionamentos populacionais em nível de espécie. Com base nos resultados apresentados pela utilização do mtDNA D-loop para as populações de *A. bockmanni* averiguadas neste estudo, constatamos a incidência de baixo fluxo gênico entre elas, de tal modo à caracterizarem-se como espécies diferentes. Porém, o teste de Mantel indica que o isolamento por distância é improvável de ter gerado o padrão de estrutura observado. O alto nível de substituições nucleotídicas que separam os grupos de haplótipos sugerem que estas populações poderiam ter sido isoladas no passado, acarretando na diferenciação no mtDNA observada entre elas. Dessa forma, diferentemente da recombinação do DNA nuclear, que homogeneiza a população, o mtDNA teria permanecido diferenciado devido a sua herança materna.

A sistemática do gênero *Astyanax* ainda é confusa e não está totalmente resolvida devido à falta de evidências que corroborem seu *status* monofilético, além da grande dificuldade na identificação de espécies que em vários casos apresentam-se como prováveis complexos de espécies. Da mesma forma, acreditamos que a análise mtDNA concomitante entre 16 populações de *A. bockmanni* de diferentes bacias hidrográficas nos permite inferir que esta espécie também compoñha um complexo, o que é suportado pela presença de diversos citótipos e polimorfismos relacionados à rDNA, NORs, heterocromatina constitutiva, histonas, dentre outros.

As análises mtDNA voltadas apenas às populações portadoras de cromossomos B indicam uma diferença e distância genética significativas da população Batalha em relação às demais. A população Batalha é a única população afora da bacia

Paraná_Paranapanema que apresentou cromossomo B_M em seu genoma. Como na bacia Paraná_Paranapanema há a presença de outras variantes de supranumerários entre as populações (B_M , B_m e B_a) acreditamos que estes elementos tenham se originado nesta bacia, e que estas variantes seriam derivadas de mecanismos de *drive*, o qual já fora reportado por outros autores. A variante B_M presente na população Batalha ou seria um evento isolado envolvendo cromossomos B, ou esta variante estaria em uma fase inicial de invasão e posterior neutralização. Nesta fase os supranumerários sofreriam mutações em suas sequências para originar novas variantes, caso contrário tendem a ser extintos. Nesse sentido, estudos adicionais se fazem necessários para confrontar as hipóteses levantadas.

Por fim, as metodologias aplicadas não diferenciaram significativamente populações de *A. bockmanni* mediante presença ou ausência de cromossomos B, porém, vale ressaltar que este trabalho é pioneiro no tocante à modelagem de nicho envolvendo cromossomos B, e de certa forma, se mostrou eficiente na projeção da distribuição das espécies e populações B^+ e B^- ao longo dos cenários modelados. Adicionalmente, validamos um marcador B_M específico, que diagnosticou a presença deste tipo de supranumerário em mais duas populações. Além disso, este é o primeiro estudo populacional com base no mtDNA D-loop efetuado em *A. bockmanni*, e da mesma forma, o primeiro envolvendo genética populacional direcionada à cromossomos B, que somadas à análises adicionais de ancestralidade e coancestralidade podem ser mais conclusivos. Portanto, fornecemos informações geográficas e genéticas interessantes desta espécie, as quais podem auxiliar na condução de outras investigações populacionais de peixes, em especial as que compõe o gênero *Astyanax*.

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.
- Albert JS, Lovejoy NR, Crampton GR (2006). Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21:14-27.
- Albert JS, Reis RE (2011). *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- Alves AL, Martins-Santos IC (2002). Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia*, 67(2):117-122.
- Alves C, Vieira F, Magalhães A, Brito M (2007). Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, 291-314.
- Allan JD, Flecker AS (1993) Biodiversity Conservation in Running Waters. *Bioscience*, 43:32-43.
- Anderson RP, Lew D, Peterson AT (2003). Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models. *Ecological Modelling*, 162:211-232.

- Anderson TJC, Komuniecki R, Komuniecki PR, Jaenike J (1995). Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? International Journal for Parasitology, 25:1001-1004.
- Artori RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC (2006). *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). Neotropical Ichthyology, 4:197-202.
- Auger DL, Birchler JA (2002) Maize tertiary trisomic stocks derived from B-A translocation. Journal of Heredity, 93:42-47.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 18:489-522.
- Avice JC (1994). *Molecular Markets: natural history and evolution*. Chapman, Hall, INS. USA.
- Avice JC (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Londres.
- Avice JC (2004). *The hope, hype, and reality of genetic engineering: Remarkable stories from agriculture, industry, medicine, and the environment*. Oxford University Press, Oxford.
- Ayala FJ (1995). The myth of eve: Molecular biology and human origins. Science, 270:1930-1936.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004). The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology, 13(4):729-744.

- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A (2013). Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *Plant Cell*, 25:2536-2544.
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Houben A (2015). Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. *Biochim, Biophys Acta Biomembranes*, 1849(1):64-70.
- Barber BR, Unmack PJ, Pérez-Losada M, Johnson JB, Crandall KA (2011). Different processes lead to similar patterns: a test of codivergence and the role of sea level and climate changes in shaping a southern temperate freshwater assemblage. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1):343.
- Barbosa P, Oliveira LA, Pucci MB, Santos MH, Moreira-Filho O, Vicar MR, Artoni RF (2015). Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica*, 143(1):55-62.
- Barbosa P, Leal E, Silva M, Almeida M, Moreira-Filho O, Artoni RF (2017). Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Comparative Cytogenetics*, 11(1):143-162.
- Barroca RM, Arantes FP, Magalhães BF, Siqueira FF, Horta CCR, Pena IF, Dergam JÁ, Kalapothakis E (2012) Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the paraopeba river, São Francisco river basin, Minas Gerais, Brazil. *Open Journal of Genetics*, 2:121-130.

- Batalha KP (2009). *Genética populacional do jaraqui de escama grossa (Semaprochilodus insignis, Prochilodontidae, Characiformes)*. Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus.
- Batista JS (2010). *Caracterização genética da dourada - Brachyplatystoma rousseauxii, Castelnau, 1855 (Siluriformes - Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo*. Tese de Doutorado. INPA. Manaus.
- Becker LA, Crichigno SA, Cussac VE (2017). Climate change impacts on freshwater fishes: a Patagonian perspective. *Hydrobiologia*, 1-18.
- Beer C, Reichstein M, Tomelleri E, Ciais P, Jung M, Carvalhais N, *et al.* (2010). Terrestrial gross carbon dioxide uptake: global distribution and covariation with climate. *Science*, 329(5993):834-838.
- Beheregaray L (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17:3754-3774.
- Bermingham E, Martin AP (1998). Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7(4):499-517.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:148-155.
- Billington N, Hebert PDN (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48:80-94.
- Boore JL (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27:1767-1780.

- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4):225-239.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C, Sbisà E (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 192(3):503-511.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PloS One*, 8(6):e66532.
- Cabrero J, López-León MD, Ruíz-Estévez M, Gómez R, Petitpierre E, Rufas JS, Camacho JPM (2013). B1 was the ancestor B chromosome variant in the western mediterranean area in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(1):54-58.
- Carmello B, Coan R, Cardoso A, Ramos E, Fantinatti B, Marques D, Oliveira R, Valente G, Martins C (2017). The hnRNP Q-like gene is retroinserted into the B chromosomes of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Chromosome Research*, 1-14.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J (1997). Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*, 149:1030-1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 355:163-178.
- Camacho JPM (2005). *B chromosomes*. In: Gregory, T.R. *The evolution of the genome*. San Diego, California, USA, p.223-286.

- Camacho JM, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R, López-León MD, Cabrero J, Lorite P, Cabral-de-Mello DC, Bakkali M (2015). A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. *Chromosoma*, 124(2):263-275.
- Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta OA, Santos, MH, Nogaroto V, Artoni RF (2014). Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 12(2):429-438.
- Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta OA, Santos MH, Nogaroto V, 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.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323:785–789.
- Cavalcanti MPC, Miranda GY (2008). Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Revista de Patologia Tropical*, 37(1):1-14.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994). *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215-220.
- Chen YH (2009). Conservation biogeography of the snake family Colubridae of China. *North-Western Journal of Zoology*, 5:251-262.
- Clabaut C, Salzburger W, Meyer A (2005). Comparative phylogenetic analyses of the adaptive radiation of Lake Tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less

- homoplasious but also less informative than mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 61(5):666-681.
- Clark FE, Conte MA, Ferreira-Bravo IA, Poletto AB, Martins C, Kocher TD (2017). Dynamic sequence evolution of a sex-Associated B chromosome in lake Malawi cichlid fish. *Journal of Heredity*, 108:53-62.
- Costa J, Peterson AT, Beard CB (2002). Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis neiva*, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67:516-520.
- Cussac VE, Fernández DA, Gómez SE, López HL (2009). Fishes of Southern South America: a story driven by temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35:29-42.
- D'Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, Kovařík A, Mas de Xaxars G, Garcia S (2017). B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist*, 216(3):635-642.
- 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 DMA, 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.
- Daniel SN, Penitente M, Silva DMZA, Hashimoto DT, Ferreira DC, Foresti F, Porto-Foresti F (2015b). Organization and chromosomal distribution of histone genes and

- transposable Rex elements in the genome of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). Cytogenetic and Genome Research, 146(4):311-318.
- Daniel-Silva MFZ, 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.
- Dauwalter DC, RAHEL FJ (2008). Distribution modelling to guide stream fish conservation: an example using the mountain sucker in the Black Hills National Forest, USA. Aquatic Conservation, 18:1263-1276.
- De Marco Jr. P, Siqueira MF (2009). Como determinar a distribuição de espécies sobre uma abordagem conservacionista. Megadiversidade (Belo Horizonte), 5:65-76.
- Deprá IC, Gomes VN, Deprá GC, Oliveira IJ, Prioli SMAP, Prioli AJ (2014). Molecular study of *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) as a probable species complex. Genetics and Molecular Research, 13(3):6015-6026.
- Dewoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 56:461-473.
- Douglas RN, Birchler JA (2017). *B Chromosomes*. In Chromosome structure and Aberrations. Springer, India, pp. 13-39.
- Dowling P (2002). The sociology of mathematics education: Mathematical myths/pedagogic texts. Routledge.
- Driscoll DA, Hardy CM (2005). Dispersal and phylogeography of the agamid lizard *Amphibolurus nobbi* in fragmented and continuous habitat. Molecular Ecology, 14(6):1613-1629.

- Elith J, Burgman MA (2002). *Predictions and their validation: rare plants in the Central Highlands, Victoria, Australia*. In: Predicting species occurrences: issues of scale and accuracy. Island Press, Covello, pp. 303-14.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudik M, *et al.* (2006). Novel methods improve prediction of species' distribution from occurrence data. *Ecography*, 29:129-151.
- Engler R, Guisan A, Rechsteiner L (2004). Na improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *Journal of Applied Ecology*, 41:263-274.
- Eschmeyer WN (2017). Catalog of Fishes. California Academy of Sciences. On line version updated 1 March 2017, disponível em <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog>. Acessado dia 16 de Dezembro de 2017.
- Eschmeyer WN, Fong JD (2014). Species by family/subfamily. Electronic version in <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em 11 de Dezembro de 2017.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:47-50.
- Fauaz G, Vicente VE, Moreira-Filho O (1994). Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, 17(2):157-163.

- Fazoli LC, Silva VDAB, Portela-Castro ALB, Júnior HFJ (2003). Chromosome characterization of *Astyanax* sp B (Characidae, Tetragonopterinae), an endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil. *Cytologia*, 68(4):389-394.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2005). Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica*, 124(2):301-306.
- Ferreira DG, Souza-Shibatta L, Shibatta OA, Sofia SH, Carlsson J, Dias JHP, Makrakis S, Makrakis MC (2017) Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. *Reviews Fish Biology Fisheries*, 27:209-231.
- Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F (2012). Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, 6(1):29-40.
- Ferrette BL, Mendonça FF, Coelho R, de Oliveira PGV, Hazin FHV, Romanov EV, Oliveira C, Santos MN, Foresti F (2015). High connectivity of the crocodile shark between the 48 Atlantic and southwest Indian Oceans: highlights for conservation. *PLoS One*, 10:e0117549.
- Ferro DAM, Néo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2000). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110(1):55-62.
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2003). B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, 119(2):147-153.

- Fiaschi P, Pirani JR (2009). Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution*, 47(5):477-496.
- Ficke AD, Myrick CA, Hansen LJ (2007). Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17(4):581-613.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981). Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 31:137-144.
- Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2):915-925.
- Gal G, Hipsey M, Rinke K, Robson B (2014). Novel approaches to address challenges in modelling aquatic ecosystems. *Environmental Modelling & Software*, 61:246-248.
- Galván-Quesada S, Doadrio I, Alda F, Perdices A, Reina RG, Varela MG, Hernández N, Mendoza AC, Bermingham E, Domínguez-Domínguez O (2016). Molecular phylogeny and biogeography of the Amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). *PloS One*, 11(4):e0153538.
- Garcez R, Calcagnotto D, Almeida-Toledo LF (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Marine Freshwater Ecosystem*, 21:268-275.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 65(4), 233-237.
- Garrido-Ramos MA, De La Herran R, Jamilena M, Lozano R, Rejón CR, Rejón MR (1999). Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(2):200-204.

- Garutti V, Britski HA (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia, 13:65-88.
- Géry J (1977). *Characoids of the World*. Neptune City: TFH. Publications. p.672.
- Guo X, Liu S, Liu Y (2006). Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics* 172:1745-1749.
- Haff T, Schmid M, Steinlein C, Galetti PM, Willard HF (1993). Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1(1):77-86.
- 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). *Genetic and Molecular Biology*, 31:275-278.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith M, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(1):64-71.
- Heist EJ (2005). Genetics: stock identification. *FAO Fisheries Technical Paper*, 474:62.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM (1996). Evidence for B chromosome drivesuppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 76:633-639.
- Hewitt GM (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1442):183-195.

- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Andy J (2005). Very high resolutions interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25:1965-1978.
- Hirzel AH, Hausser J, Chessel D, Perrin N (2002). Ecological-niche factor analysis: how to compute habitat-suitability maps without absence data? *Ecology*, 83:2027-2036.
- Hoorn C, Wesselingh FP, Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Antonelli A (2010). Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 927(330): 927-931
- Hoarau G, Holla S, Lescasse R, Stam WT, Olsen JE (2002). Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Molecular Biology and Evolution*, 19:2261-2264.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2013). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3):467-478.
- Houben A (2017). B Chromosomes - A matter of chromosome drive. *Frontiers in Plant Science*, 8:210.
- Holderegger R, Wagner HH (2006). A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21:793-796.
- Jesus CM, Galetti Jr. 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.
- Johansen H, Guddal PH, Johansen T (1990). Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acid Research*, 18:411-419.

- Jorgensen SE, Fath BD (2011). Concepts of modelling. *Developments in Environmental Modelling*, 23:19-93.
- Joly CA, Aida MPM, Klink CA, McGrath DG, Moreira A, Moutinho P, Nepstad D, Oliveira A Pott A, Rodal MJN, Sampaio EVSB (1999). Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura*, 51(5/6):331-348.
- Jones R, Rees H (1982). *B Chromosomes*. Academic Press, London.
- Jones RN (1985) Are B chromosome selfish? The evolution of genome size. *Wiley*, 397-425.
- Jones N (2017). New species with B chromosomes discovered since 1980. *Nucleus*, 60(3):263-281.
- Kavalco KF, Moreira-Filho O (2003). Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia*, 56(4):453-461.
- 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, Pazza R, Almeida-Toledo LF (2009). *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: An ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica*, 136:135-139.
- Kavalco KF, Pazza R, Brandão, KO, Almeida-Toledo LF (2013). Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Organisms Diversity and Evolution*, 13(1):67-76.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28:1647-1649.
- Keyl HG, Hägele K (1971). B chromosome bei *Chironomus*. *Chromosoma*, 36:403-417.
- Kuchta SR, Parks DS, Wake DB (2009). Pronounced phylogeographic structure on a small spatial scale: geomorphological evolution and lineage history in the salamander ring species *Ensatina eschscholtzii* in central coastal California. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(2):240-255.
- Leach CR, Houben A, Field B, Pistrick K, Demidov D, Timmis JN (2005). Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*, 171(1):269-278.
- Leigh JW, Bryant D (2015). popART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9):1110-1116.
- Leuzzi MSP, Almeida FS, Orsi ML, Sodr  LMK (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema river, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27:355-362.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Levine RS, Peterson AT, Yorita KL, Carroll D, Damon IK, Reynolds MG (2007). Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PloS One*, 2:e176.
- Li Y, Jing XA, Aldrich JC, Clifford C, Chen J, Akbari OA, Ferree PM (2017). Unique sequence organization and small RNA expression of a “selfish” B chromosome. *Chromosoma*, 126(6):753-768.

- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP *et al.* (2003). *Genera incertae sedis in Characidae*. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Lino GL (2009). A fraude do aquecimento global: como um fenômeno natural foi convertido numa falsa emergência mundial. Capax Dei.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dynamics*, 7:1-28.
- López-León MD, Veves N, Schwarzacher JS, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research*, 2:87-92.
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJA (2000). Comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in populationsStudies of the *Massasauga rattlesnake*. *Journal of Heredity*, 6:458-463.
- Lucena CAS, Castro JB, Bertaco VA (2013). Three new species of *Astyanax* from drainages of southern Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 11(3):537-552.
- Lundberg JG (1993). *African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm*. In: Biological Relationships Between Africa and South America (ed. Goldblatt P). Yale University Press, New Haven, CT.
- Mabuchi K, Miya M, Satoh TP, Westneat MW, Nishida M (2004). Gene rearrangements and evolution of tRNA pseudogenes in the mitochondrial genome of the parrotfish (Teleostei: Perciformes: Scaridae). *Journal of Molecular Evolution*, 59:287-297.

- Machado VN (2009). *Análise da variabilidade genética da curimatã Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários*. Mestrado, UFAM, Manaus.
- Machado DP, Miranda EA, Dessi MC, Sabadini CP, Del Lama MA (2016). Occurrence and origin of supernumerary chromosomes in *Partamona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Cytogenetic and Genome Research*, 150(1):68-75.
- Mackay IM (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3):190-212.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1992). Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, 87:101-106.
- Maistro EL, Dias AL, 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 (1999). R-and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetic and Molecular Biology*, 22(2):201-204.
- Malcolm JR, Markham A, Planet CAC (2000). *Global warming and terrestrial biodiversity decline: A modelling approach. Report prepared for the World Wildlife Fund*.
- Mallet J, Isaac NJ, Mace GM (2005). Response to Harris and Froufe, and Knapp *et al.*: Taxonomic inflation. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(1), 8-9.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics *Trends. Ecology and Evolution*, 18(4):189-197.

- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Marques ÉAT, Oliveira LJ (2016). Mudanças Climáticas e Refugiados Ambientais (Climate change in the Brazilian Northeast and environmental refugees). *Revista Brasileira de Geografia Física*, 9(4):965-984.
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Šimková H, Novák P, Neumann P, Kubaláková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Doležel J, Stein N, Mayer KFX, Houben A (2012). Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organelar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33):13343-13346.
- Martins MA, Carrilho FJ, Alves VF, Castilho E (2016). *Clínica Médica, Doenças Hematológicas, Oncologia, Doenças Renais*, Vol. 3, 2ª ed., Manole.
- Martins NF, Bertollo LAC, Troy WP, Feldberg E, Souza FCV, Cioffi MB (2013). Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Reviews Fish Biology Fisheries*, 23(2):261-269.
- Matoso DA, Martins C, Artoni RF, Galetti-Jr. PM (2010). Preliminary qualitative analysis on mtDNA in *Astyanax fasciatus* populations Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae) indicate population distinctiveness. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53:663-667.
- Matsumoto CK, Hilsdorf AWS (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, 7:395-402.

- Melo BF, Sidlauskas BL, Hoekzema K, Vari RP, Oliveira C (2014). The first molecular phylogeny of Chilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) reveals cryptic biodiversity and taxonomic uncertainty. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70:286-295.
- Melo BF, Ochoa LE, Vari RP, Oliveira C (2016). Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*, 45(6):650-658.
- Melo BF, Benine RC, Silva GS, Avelino GS, Oliveira C (2016b). Molecular phylogeny of the Neotropical fish genus *Tetragonopterus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94:709-717.
- Melo BF, Sidlauskas BL, Hoekzema K, Frable BW, Vari RP, Oliveira C (2016c). Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102:189-201.
- Mello R, Maniglia TC, Prioli SMAP, Prioli AJ (2015). Genetic and biogeographical relationships among species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae) in Brazilian river basins. *Genetics and Molecular Research*, 14(4):15356-15364.
- Mendonça FF, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2013). Diversity and genetic population structure of the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii*. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems*, 23:850-857.
- Menni RC (2004). Peces y ambientes en la Argentina continental. *Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 5:1-316.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85:1-9.

- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347(6293):550.
- Meyer A (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2:1-38.
- Meyer A (1994). Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trend Ecology Evolution*, 9(8):278-280.
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD (1991). A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. *Science*, 254:1773-1776.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26:121-138.
- Mobley KB, Small CM, Jue NK, Jones AG (2010). Population structure of the dusky pipefish (*Syngnathus floridae*) from the Atlantic and Gulf of Mexico, as revealed by mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *Journal of Biogeography*, 37(7):1363-1377.
- Montoya-Burgos JI (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12:1855-1867.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14(2):331-357.

- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001). Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 66:59-64.
- Moreira-Filho O, Galetti 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.
- Muñoz-Pajares AJ, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM, Perfectti F (2011). A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics*, 187(3):853-863.
- Naimi B, Araújo MB (2016). sdm: a reproducible and extensible R platform for 506 species distribution modelling. *Ecography*, 39:368-375.
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD (2017). Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal condensin complex genes in a grasshopper. *Scientific Reports*, 7(1):17650.
- Nelson JS (2006). *Fishes of the world*, John Wiley e Sons, New York, p.601.
- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108:211-215.
- Nur U (1966). Harmful B chromosomes in a mealy bug population. *Genetics*, 54:1225-1238.
- O'Leary SJ, Feldheim KA, Fields AT, Natanson LJ, Wintner S, Hussey N, Shivji MS, Chapman DD (2015). Genetic diversity of white sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northwest Atlantic and Southern Africa. *Journal of Heredity*, 106(3):258-265.

- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988). Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41:227-236.
- Oliveira C, Saboya SMR, Foresti F, Senhorini JA, Bernardino G (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, 79:473-476.
- Oliveira AV, Prioli AJ, Prioli SMAP, Pavanelli CS, Júlio-Jr HF, Panarari RS (2002). Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, 115:259-267.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009). Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*, 35:81-100.
- Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC (2011). Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*, 4(1):24.
- O'Loughlin PM, Paulay G, Davey N, Michonneau F (2010). The antartic region as a marine biodiversity hotspot for echinoderms: diversity and diversification of sea cucumbers. *Deep sea Research part II Topical Studies in Oceanography*, 58(1):264-275.
- Ortí G, Petry P, Porto JI, Jégu M, Meyer A (1996). Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42:169-182.
- Östergren G (1945). Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Botaniska Notiser*, 2:157-163.

- 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, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F (2013). Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(4):477-489.
- Pansonato-Alves JC, Hilsdorf AWS, Utsunomia R, Silva DMZA, Oliveira C, Foresti F (2013b). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3):133-142.
- Patarnello T, Marcato S, Zane L, Varotto V, Bargelloni L (2003). Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28:420-429.
- Patten BC, Auble GT, (1981). System theory of the ecological niche. *American Naturalist*, 117:893-922.
- 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 Ciências*, 85(4):1371-1377.
- Penitente M, Daniel SN, Scudeler PES, Foresti F, Porto-Foresti F (2016). B chromosome variants in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) analyzed by microdissection and chromosome painting techniques. *Caryologia*, 69(2):181-186.

- Perdices A, Cunha C, Coelho M (2004). Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31:192-203.
- Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*, 18:215-225.
- Perfectti F, Werren JH (2001). The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*, 55:1069-1073.
- Pereira SL (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetic and Molecular Biology*, 23:745-752.
- Peres WAM, Buckup PA, Kantek DLZ, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2009). Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica*, 137(3):305.
- Peterson AT, Papes M, Reynolds MG, Perry ND, Hanson B, Regnery RL, Hutson CL, Muizniek B, Damon IK, Carroll DS (2006). Native-range ecology and invasive potential of *Cricetomys* in North America. *Journal of Mammalogy*, 87:427-432.
- Petri S e Fulfaro VJ (1983). *Geologia do Brasil*. Edusp, São Paulo.
- Pickles RSA, Groombridge JJ, Rojas VZ, Van Damme P, Gottelli D, Kundu S, Jordan WC (2011). Evolutionary history and identification of conservation units in the giant otter, *Pteronura brasiliensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3):616-627.

- Pie, MR, Baggio R, Boeger W, Patella L, Ostrensky A, Vitule J, Abilhoa V (2009). Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguazu river. *Journal of Fish Biology*, 75:2357-2362.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:2934-2938.
- Piva LH, Siqueira-Silva DH, Goes CAG, Fujimoto T, Saito T, Dragone LV, Senhorini JA, Porto-Foresti F, Ferraz JBS, Yasui GS (2018). Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology*, 108:239-244.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene*, 409:72-82.
- Pohler W, Schlegel R (1990). A rye plant with frequent A-B chromosome pairing. *Hereditas*, 112:217-220.
- Poesch MS, Chavarie L, Chu C, Pandit SN, Tonn W (2016). Climate change impacts on freshwater fishes: a Canadian perspective. *Fisheries*, 41(7):385-391.
- Polasky S, Solow AR (2001). The value of information in reserve site selection. *Biodiversity and Conservation*, 10:1051-1058.
- 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. *Revista Brasileira de Genética*, 20:377-380.
- Prado FD, Daniel SN, Penitente M, Hashimoto DT, Foresti F, Porto-Foresti F (2016). First description of supernumerary chromosomes in *Ictalurus punctatus* Rafinesque 1818 reveals active ribosomal genes in the B complement. *Folia Biologica*, 64(4):245-252.

- Prioli AJ, Carlo VA, Soria TV, Prioli SMAP, Pavanelli CS, Prioli RA, Gomes VN, Júlio Jr. HF, Prioli LM (2012). Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. *Genetics and Molecular Research*, 11(2):1064-1074.
- Prioli SM, Prioli AJ, Júlio Jr HF, Pavanelli CS, Oliveira AVD, Carrer H, Prioli LM (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetic and Molecular Biology*, 25(4):421-430.
- Raemaekers T, Ribbeck K, Beaudouin J, Annaert W, Van Camp M, Stockmans I, Smets N, Bouillon R, Ellenberg J, Carmeliet G (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *The Journal of Cell Biology*, 162(6):1017-1029.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C (2003). *Check list of freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 742.
- Reis KV, Venere PC, Sampaio I, Rêgo PS, Vallinoto M, Souza IL (2015). Downstairs gene flow: the effects of a linear sequence of waterfalls on the only population of the endangered minnow *Astyanax xavante*. *Journal of Fish Biology*, 87(3):754-762.
- Reeves RG, Bermingham E (2006). Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88(2):35-255.
- Ribeiro AC (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of fauna evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4:225-246.

- Robles F, de La Herrán R, Ludwig A, Rejón CR, Rejón MR, Garrido-Ramos MA (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene*, 338(1):133-142.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19:2496-2497.
- Rossini BC, Oliveira CAM, Melo FAG, Bertaco VA, Astarloa JMD, Rosso JJ, Foresti F, Oliveira C (2016). Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PLoS One*, 11(12):e0167203.
- Rousset F (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145:1219-1228.
- Ruban A, Schmutzer T, Scholz U, Houben A (2017). How Next-Generation sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. *Genes*, 8(11):294.
- Ruíz-Estévez M, Lopez-Leon MD, Cabrero J, Camacho JPM (2012). B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS One*, 7(5):e36600.
- Ruíz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2013). Ribosomal DNA is active in different B chromosome variants of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica*, 141(7-9):337-345.
- Ruíz-Estévez M, Badisco L, Broeck JV, Perfectti F, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2014). B chromosomes showing active ribosomal RNA genes contribute insignificant amounts of rRNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6):1209-1216.

- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2016). High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports*, 6: 28333.
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (2016b). Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma*, 126(4):487-500.
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit E, Zemplak TS, Adams ED (2008). Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*, 17(9):2234-2244.
- Saadi A (1993). Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretações preliminares. *Revista Geonomos*, 1:1-15.
- Sala A, Piper F, Hoch G (2010). Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytologist*, 186(2):274-281.
- Salvador LB, Moreira-Filho O (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69(1):50-6.
- Santos MDCF, Ruffino ML, Farias IP (2007). High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71(sa):33-44.
- Santos LPD, Castro JP, Francisco CMD, Vicari MR, Almeida MCD, Goll LG, Gusso L, Morelli S, Artoni RF (2013). Cytogenetic analysis in the Neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*, 6(1):1-10.
- Sarnat EM, Moreau CS (2011). Biogeography and morphological evolution in a Pacific island ant radiation. *Molecular Ecology*, 20(1):114-130.

- Saunders NA (2004). *Quantitative real-time PCR. Real-time PCR: an essential guide*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp. 103-125.
- Schaefer SA (1998). *Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae)*. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, pp. 375-400.
- Schaefer SA, Arroyave J (2010). Rivers as islands: determinants of the distribution of Andean astroblepid catfishes. *Journal of Fish Biology*, 77:2373-2390.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV, McGovern TM, Bowen BW (2008). Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*, 17:5336-5348.
- Schedina IM, Hartmann S, Groth D, Schlupp I, Tiedemann R (2014). Comparative analysis of the gonadal transcriptomes of the all-female species *Poecilia formosa* and its maternal ancestor *Poecilia mexicana*. *BMC Research Notes*, 7(1):249.
- Serrano EA, Utsunomia R, Scudeller PS, Oliveira C, Foresti F (2017). Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. *Comparative Cytogenetics*, 11(1): 81-95.
- Shadel GS, Clayton DA (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66:409 - 435.
- Shum J (2013). Jerry Blogger: Notepad++ v6. 5.1-Current Version with DIRECT DOWNLOAD link - <https://notepad-plus-plus.org/download/v7.5.4.html>.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141(7-9):329-336.

- 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 DM, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2015). Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. Cytogenetic and Genome Research, 146(2):144-152.
- Silva DMZA, Daniel SN, Camacho JPM, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Penitente M, Pansonato-Alves JC, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (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.
- Silva DMDA, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Oliveira C, Foresti F (2016b). The complete mitochondrial genome sequence of *Astyanax paranae* (Teleostei: characiformes). Mitochondrial DNA Part B, 1(1):586-587.
- Silva DMZA, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti F (2017). High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. Scientific Reports, 7(1):12726.
- Sillero N (2011). What does ecological modelling model? A proposed classification of ecological niche models based on their underlying methods. Ecological Modelling, 222(8):1343-1346.

- Siqueira MF, Durigan G (2007). Modelagem da distribuição geográfica de espécies lenhosas de cerrado no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, 30:239-249.
- Sivasundar A, Bermingham E, Orti G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10:407-417.
- Soberón J, Peterson AT, (2005). Interpretation of models of fundamental ecological niches and species distributional areas. *Biodiversity Informatics*, 2:1-10.
- Sofia SH, Silva CRM, Galindo BA, Almeida FS, Leda MK, Sodr   LMK, Martinez CBR (2008) Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, 553:245-254.
- Suguio K, Bigarella JJ (1990). *Ambientes fluviais*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75:304-306.
- Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):585-595.
- 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 RA, Matoso DA, Artoni RF (2004) Genética de peixes neotropicais. *Biologia Molecular de peixes neotropicais. Ciências Biológicas e da Saúde*, 10:27-37.
- Torres-Mariano AR, Morelli 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 PC, Perelman PL, Yang F, Graphodatsky AS (2013). Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biology*, 11(1):1-11.
- Triponez Y, Buerki S, Borer M, Naisbit RE, Rahier M, Alvarez N (2011). Discordances between phylogenetic and morphological patterns in alpine leaf beetles attest to an intricate biogeographic history of lineages in postglacial Europe. *Molecular Ecology*, 20(11):2442-2463.
- Tschá MK, Baggio RA, Marteleto FM, Abilhoa V, Bachmann L, Boeger WA (2017). Sea-level variations have influenced the demographic history of estuarine and freshwater fishes of the coastal plain of Paraná, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 90(3):968-979.
- Tsoumani KT, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Mathiopoulos KD (2013). Molecular characterization and chromosomal distribution of a species-specific transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *PloS One*, 8:e79393.
- Ugarković D, Plohl M (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The EMBO Journal*, 21:5955-5959.
- Ugarković, D (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *Embo Reports*, 6:1035-1039.

- Ursing BM, Arnason U (1998). Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus-whale clade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 265:2251-2255.
- 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 C (2016). Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PloS One*, 11(3):e0150573.
- Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Silva DMZA, Serrano EA, Rosa IF, Scudeler PES, Hashimoto DT, Oliveira C, C JPM, Foresti F (2017). A glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). *Frontiers in Genetics*, 8:103.
- Vasconcelos, TS (2014). Tracking climatically suitable areas for an endemic Cerrado snake under climate change. *Natureza & Conservação*, 12(1):47-52.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C (2011). Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133:34-42.
- 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*, 31:2061-2072.
- Valente GT, Nakajima RT, Fantinatti BEA, Marques DF, Almeida RO, Simões RP, Martins C (2017). B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, 126:73-81.

- Vari RC, Natarajan LA, Whitescarver SA, Jackson BA, Ott CE (1988). Induction, prevention and mechanisms of contrast media-induced acute renal failure. *Kidney International*, 33(3):699-707.
- Vari RP, Weitzman SH (1990). *A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America*. In: *Vertebrates in the Tropics*, pp. 381-394.
- Vari RP, Castro RMC (2007). New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia*, 1:150-162.
- Verburg P, Hecky RE, Kling H (2003). Ecological consequences of a century of warming in Lake Tanganyika. *Science*, 301(5632):505-507.
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011). New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and *FISH*. *Genetica*, 139:1073-1081.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 74(1-2):70-75.
- Vilella FS, Becker FG, Hartz SM, Barbieri G (2004). Relation between environmental variables and aquatic megafauna in a first order stream of the Atlantic Forest, southern Brazil. *Hydrobiologia*, 528:17-30.
- 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.
- Voltolin TA, Pansonato-Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto-Foresti F (2013). Common descent of B chromosomes in two species of the fish

- genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). Cytogenet. Genome Research, 141(2-3):206-211
- Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Fröhlich J, Rubes J (2017). Satellite DNA sequences in Canidae and their chromosome distribution in dog and red fox. Cytogenetic and Genome Research, 150(2):118-127.
- Xia X (2017). DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. Journal of Heredity, 108(4):431-437.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003). An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26:1-7.
- Xia X, Lemey P (2009). *Assessing substitution saturation with DAMBE*. In: The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny, 2nd Edition, Cambridge University Press, pp. 615-630.
- Weitzman SH, Vari RP (1988). Miniaturization in South American freshwater fishes: an overview and discussion. Proceedings of the Biological Society of Washington, 101(2):444-465.
- Wiens JA, Stralberg D, Jongsomjit D, Howell CA, Snyder MA (2009). Niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106:19729-19736.
- White MJD (1973) *Animal cytology and evolution*. Cambridge Univ Press, p. 961.
- Woodward G, Perkins DM, Brown LE (2010). Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 365(1549):2093-2106.

- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:9054-9058.
- Wright S (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15:323-354.
- Wright S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 395-420.
- Yudkin DV, Trifonov VA, Kukekova AV, Vorobieva NV, Rubtsova NV, Yang F, Acland GM, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS (2007). Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 116(1-2):100-103.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N (2011). B Chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics*, 7:e1002203.
- 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.
- Zaniboni, EF (1997). O desenvolvimento da piscicultura brasileira sem a deterioração da qualidade de água. *Revista Brasileira de Biologia*, 57(1):3-9.
- Zimmermann NE, Edwards TC, Graham CH, Pearman PB, Svenning JC (2010). New trends in species distribution modelling. *Ecography*, 33:985–989.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution*, 52:274-277.

*FIGURAS E TABELAS
COMPLEMENTARES*

7 TABELAS E FIGURAS COMPLEMENTARES

7.2 Figuras complementares

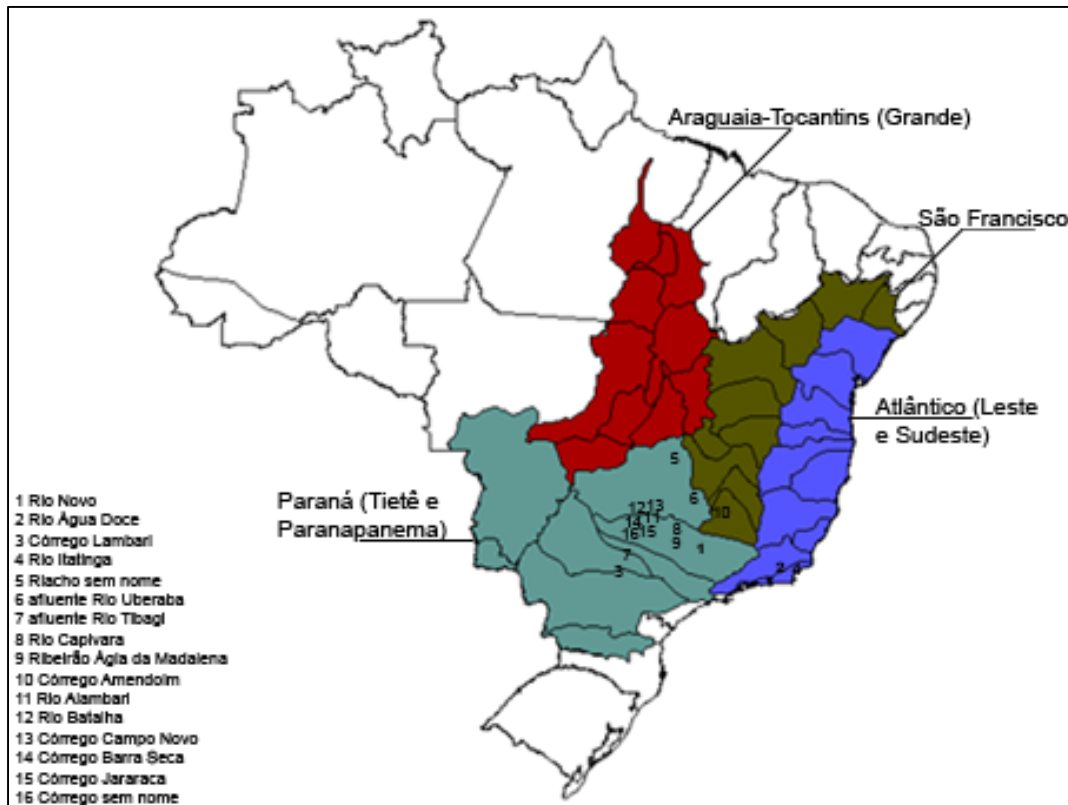


Figura complementar 1: relação das populações de *Astyanax bockmanni* amostradas de acordo com suas respectivas bacias e sub-bacias hidrográficas.

7.2 Tabelas Complementares

Tabela complementar 1: relação das populações não portadoras de cromossomos B utilizadas nos procedimentos de modelagem.

Espécie	Latitude/Longitude	Município/Estado
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°14'43.3" W 54°48'47"	Dourados, MS
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°12'1.3" W 54°53'10"	Dourados, MS
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°11'00" W 54°45'05.3"	Dourados, MS
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°02'06.5" W 47°57'27"	São Carlos, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 21°59'9.26" W 47°52'52.59"	São Carlos, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 25°32'35.0" W 53°29'47.1"	Nova Prata do Iguaçu, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°45'3.11" W 49°22'80.17"	Agudos, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 21°41'21.3" W 49°18'39.4"	Pongaí, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°6'40.92" W 49°16'5.81"	Avaí, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°11'51.6" W 48°56'32.9"	Avaré, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 21°55'33.4" W 47°22'10.5"	Pirassununga, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 21°14'23.1" W 49°55'36.8"	Penápolis, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°26'14.7" W 51°55'12.3"	Maringá, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°31'23" W 45°51'42"	Salesópolis, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°48'45" W 47°42'30"	Pilar do Sul, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°05'39" W 47°15'37"	Indaiatuba, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 21°25'11" W 50°04'39"	Penápolis, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°05'55" W 48°55'32"	Avaré, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°44'56.6" W 51°04'41.1"	Tabarana, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 25°11'53.5" W 50°09'08.7"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 25°35'22.7" W 49°15'05.3"	Curitiba, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°45'60" W 53°15'22"	Porto Rico, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°53'53.1" W 49°58'50.0"	Salto Grande, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°27'6.12" W 49°14'25.76"	Bauru, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°59' W 52°20'	Campo Mourão, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°46' W 47°43'	São Miguel Arcanjo, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°42'16.8" W 47°46'43.4"	Piracicaba, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 25°55'26.0" W 52°10'17.6"	Mangueirinha, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 22°41'17.7" W 51°05'23.9"	Iepê, SP
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°19'09.38" W 51°11'44.72"	Londrina, PR
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°50'16.65" W 54°20'55.54"	Mundo Novo, MS
<i>Astyanax altiparanae</i>	S 23°54'50.20" W 54°17'28.76"	Mundo Novo, MS
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 23°51'04.9" W 54°25'13.9"	Japorã, MS
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°53'57" W 48°23'11"	Botucatu, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°53'30" W 48°28'36"	Botucatu, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°59'25" W 48°25'40"	Botucatu, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°6'40.92" W 49°16'5.81"	Bauru, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°23'8.35" W 49°55'63"	Agudos, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 22°27'6.12" W 48°53'44.34"	Bauru, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 23°54'74.30" W 47°57'67.50"	São Miguel Arcanjo, SP
<i>Astyanax bockmanni</i>	S 23°48'75.50" W 47°42'52.70"	Pilar do Sul, SP

<i>Astyanax fasciatus</i>	S 25°14'9" W 50°00'17"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 13°51'51" W 40°04'54"	Jequié, BA
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 13°45'84" W 39°56'47"	Jequié, BA
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 13°60'54" W 39°41'54"	Ipiaú, BA
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°30'22.6" W 52°00'09.4"	Maringá, PR
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 18°47'25" W 48°08'50"	Uberlândia, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°01'15.7" W 45°39'02.1"	Piracicaba, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 21°55'38.2" W 47°22'00.9"	Pirassununga, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 21°10'10.8" W 48°10'15.2"	Barrinha, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 22°18'53.3" W 46°22'11.0"	Ouro Fino, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°35'35.5" W 45°58'10.2"	Mogi das Cruzes, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 25°13'23.5" W 50°02'23.5"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 25°14'27.7" W 50°02'59.5"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 25°13'22.2" W 50°04'25.9"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 24°28'48.8" W 47°50'16.4"	Registro, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 22°27'6" W 49°14'25"	Piratininga, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°27'11" W 46°17'00"	Confusão, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°20'31" W 45°59'03"	Regalo, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°26'33" W 46°15'58"	Confusão, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°31'55" W 46°02'42"	Piumhi, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°26'11" W 45°47'31"	Pimenta, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°34'58" W 46°00'15"	Passos, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°40'43" W 46°20'26"	São José da Barra, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 20°39'17" W 46°12'59"	Capitólio, MG
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 22°22'9.94" W 47°25'8.25"	Araras, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°32'9.84" W 48°30'7.43"	Angatuba, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°48'7.55" W 47°42'5.27"	Pilar do Sul, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 24°18'6.78" W 47°53'5.28"	Juquiá, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°31'4.04" W 45°51'7.16"	Salesópolis, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 23°5'6.52" W 47°15'6.36"	Indaiatuba, SP
<i>Astyanax fasciatus</i>	S 13°55'38" W 39°57'53"	Jequié, BA
<i>Astyanax paranae</i>	S 22°50'32.2" W 48°32'59.6"	Botucatu, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 23°04'32.7" W 48°23'11.7"	Pardinho, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 23°05'15.4" W 48°38'05.1"	Itatinga, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 23°06'23.6" W 48°35'21.3"	Itatinga, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 23°03'34.1" W 48°23'19.3"	Pardinho, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 22°56'29.1" W 48°31'04.9"	Botucatu, SP
<i>Astyanax paranae</i>	S 23°22'23.41" W 51°50'47.70"	Maringá, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 25°04'81" W 50°04'63"	Ponta Grossa, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 25°44'89" W 49°67'44"	Lapa, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 24°35'42" W 49°25'67"	Dr. Ulisses, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 22°17'26.4" W 47°50'02.0"	Itirapina, SP
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 23°06'49.1" W 52°26'53.9"	Paranavaí, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 23°20'15.1" W 51°11'44.3"	Martinópolis, SP
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 23°06'07.5" W 48°34'33.1"	Itatinga, SP
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 23°24'35.3" W 51°50'40.9"	Maringá, PR
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 22°50'50" W 44°50'9.40"	Silveiras, SP
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 18°30'53.0" W 45°15'43.6"	Três Marias, MG

<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 18°19'56.7" W 45°49'50.1"	São Gonçalo do Abaeté, MG
<i>Astyanax scabripinnis</i>	S 22°43'33.20" W 45°33'7.40"	Campos do Jordão, SP
<i>Astyanax schubarti</i>	S 21°55'38.2" W 47°22'00.9"	Pirassununga, SP

Tabela complementar 2: Teste de significância de saturação.

IssSym is Iss.c – topologia simétrica.

IssAsym is Iss.c – topologia assimétrica.

NumOTU	Iss	Iss.cSym	T	DF	P	Iss.cAsym	T	DF	P
4	0,349	0,805	20,603	655	0,0000	0,774	19,199	655	0,0000
8	0,375	0,765	15,209	655	0,0000	0,656	10,936	655	0,0000
16	0,419	0,744	11,375	655	0,0000	0,534	4,027	655	0,0001
32	0,448	0,718	8,633	655	0,0000	0,392	1,789	655	0,0740

Grau de diferença significativa

	Sim	Não
Iss < Iss.c	pequena saturação	saturação substancial
Iss > Iss.c	Sequências inutilizadas	Muito ruim filogeneticamente

Tabela complementar 3: Matriz de distância entre as populações com base nos valores Φ_{ST} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0.00000															
2	0.77357	0.00000														
3	0.72572	0.68873	0.00000													
4	0.78024	0.67014	0.58588	0.00000												
5	0.83182	0.72004	0.72868	0.73766	0.00000											
6	0.88410	0.78351	0.77028	0.82837	0.84430	0.00000										
7	0.92665	0.76941	0.89292	0.87768	0.89518	0.96694	0.00000									
8	0.72039	0.70049	0.55396	0.68999	0.69451	0.70377	0.83668	0.00000								
9	0.79497	0.77082	0.62272	0.76224	0.78181	0.81601	0.89766	0.57415	0.00000							
10	0.81247	0.78956	0.65805	0.78471	0.81947	0.90399	0.93883	0.65709	0.76169	0.00000						
11	0.79820	0.77530	0.72823	0.78730	0.76659	0.76617	0.87274	0.69365	0.76611	0.79632	0.00000					
12	0.80986	0.78395	0.75828	0.80620	0.83128	0.85583	0.90764	0.69802	0.79140	0.84102	0.79262	0.00000				
13	0.76104	0.72064	0.71829	0.76795	0.77348	0.75212	0.84352	0.69284	0.75030	0.76951	0.75678	0.72086	0.00000			
14	0.75060	0.72181	0.64068	0.74119	0.74894	0.76867	0.86595	0.60174	0.70660	0.74133	0.74948	0.58968	0.70315	0.00000		
15	0.72753	0.69963	0.66579	0.72305	0.73737	0.74497	0.84056	0.63574	0.72201	0.73733	0.74911	0.65438	0.69361	0.61266	0.00000	
16	0.78611	0.73461	0.61597	0.73122	0.77893	0.86398	0.92545	0.59183	0.71526	0.79071	0.75084	0.79013	0.71904	0.67979	0.68288	0.00000

1: Água Doce; 2: Itatinga; 3:Uberaba; 4:Riacho sem nome (Aporé); 5: Tibagi; 6: Novo; 7: Água da Madalena; 8: Jararaca; 9: Córrego sem nome (Paulistânia); 10: Lambari; 11: Alambari; 12: Campo Novo; 13: Batalha; 14: Barra Seca; 15: Capivara; 16: Amendoim

Tabela complementar 4: Matriz de distância entre grupos de acordo com as bacias hidrográficas com base nos valores Φ_{ST} .

	1	2	3	4	5
1	0.00000				
2	0.24006	0.00000			
3	0.33738	0.24851	0.00000		
4	0.38350	0.18085	0.34654	0.00000	
5	0.39510	0.25344	0.31559	0.31324	0.00000

1: Grande_Paranaíba; 2: Paranapanema_Paraná; 3: Atlântico;
4: São Francisco; 5: Tietê

Tabela complementar 5: tabela com os valores considerados de nos testes de D de Tajima e Fs de Fu.

	Statistics	Novo	Amendoim	Uberaba	Aporé	Alambari	Tibagi	Água da Madalena	Paulistânia	Jararaca	Lambari	Itatinga	Água Doce	Batalha	Capivara	Barra Seca	Campo Novo	Mean	SD
Tajima's D test	Sample size	7	6	7	7	23	7	8	13	16	6	7	7	29	11	14	16	11.50	6.742
	S	9	43	37	43	84	46	3	63	101	16	77	54	120	112	115	15	58.62	39.16
	Pi	4.285	30.40	44.09	43.42	39.15	42.28	8.357	34.51	51.73	26.40	66.47	31.04	49.95	4.40	45.42	24.00	37.87	17.21
	Tajima's D	0.885	0.079	-1.215	1.492	2.121	1.078	1.219	0.884	2.473	1.817	1.058	-0.41	1.822	2.055	0.496	-1.722	0.883	1.194
	D p-value	0.885	0.539	0.124	0.957	0.993	0.901	0.898	0.851	0.999	0.983	0.897	0.373	0.979	0.995	0.745	0.025	0.756	0.318
Fu's FS test	Real alleles	7	6	6	7	17	6	8	11	14	6	7	7	14	9	14	12	9.437	3.669
	Orig. alleles	7	6	6	7	17	6	8	11	14	6	7	7	14	9	14	12	9.437	3.669
	Theta_pi	4.285	30.40	44.09	43.42	39.15	42.28	8.357	34.51	51.73	26.40	66.47	31.04	49.95	64.40	45.42	24.00	37.87	17.21
	Exp. no. of alleles	4.476	5.559	6.565	6.559	18.27	6.549	5.864	11.17	14.059	5.500	6.703	6.405	23.05	10.22	12.32	12.46	9.734	5.253
	FS	-3.39	0.521	2.701	0.534	1.596	2.627	-2.570	0.991	0.825	0.352	1.026	0.122	10.98	3.326	-1.65	1.031	1.189	3.176
	FS p-value	0.013	0.317	0.824	0.376	0.790	0.822	0.0480	0.641	0.609	0.349	66.47	0.315	0.999	0.912	0.132	0.675	0.518	0.307

Tabela complementar 6: valores do teste de isolamento por distância – Teste de Mantel.

Testes e valores estatísticos considerados	Todas as populações	Grupos
Mean value Y	0.756768	0.301422
Sums of squares Y	0.790454	0.042588
Mean value X1	260.297083	253.007000
Sums of squares X1	4955217.892479	153432.883010
ZY1	23471.574273	753.588903
Sum of products (SP(Y,X1))	-166.575452	-9.028699
Regression coefficient (bY1)	-0.000034	-0.000059
Correlation coefficient (rY1)	-0.084167	-0.111693
Determination of Y by X1(%)	0.007084	0.012475
Significance testing (10000 permutations for Mantel test)		
P(rY1 rand >= rY1 obs)	0.631800	0.606300
No. of smaller rand rY1	3682	3937
No. of equal rand rY1	0	86
No. of larger rand rY1	6318	5977

Tabela complementar 7: AMOVA com base no mtDNA D-loop entre todas as populações de *A. bockmanni* amostradas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	P
Entre populações	10940.190	63.02164 Vb	75.75	-
Dentro das populações	3388.538	20.16987 Vc	24.25	-
Total	14328.728	85.05750		-
Índice de Fixação: Φ_{ST} : 75755				0

Tabela complementar 8: AMOVA mtDNA D-loop envolvendo grupos (Tietê/Paraná_Paranapanema x Ggande_Paranaíba/Atlântico, São Francisco) de acordo com as bacias hidrográficas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	P
Entre grupos	1412.056	-1.17540 Va	7.63	-
Entre populações	1818.230	24.65002 Vb	68.66	-
Dentro das populações	11098.442	62.00247 Vc	23.71	-
Índices de Fixação: Φ_{SC} : 0.74328 Φ_{ST} : 0.76287 Φ_{CT} : 0.07630				0 0 0.5386

Tabela complementar 9: AMOVA baseada em mtDNA D-loop envolvendo apenas populações de *A. bockmanni* portadoras de cromossomos B.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	P
Entre populações	3759.591	65.67104 Vb	76.20	-
Dentro das populações	1886.619	20.96243 Vc	23.80	-
Total	7099.427	88.91574		-
Índice de Fixação: Φ_{ST} : 0.76196				0