

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(GENÉTICA)

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DE CROMOSSOMOS
SUPERNUMERÁRIOS EM PEIXES, UTILIZANDO COMO MODELO
Haplochromis obliquidens (Perciformes, Cichlidae)

BRUNO EVARISTO DE ALMEIDA FANTINATTI

Botucatu/SP
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(GENÉTICA)**

**CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DE CROMOSSOMOS
SUPERNUMERÁRIOS EM PEIXES, UTILIZANDO COMO MODELO
Haplochromis obliquidens (Perciformes, Cichlidae)**

BRUNO EVARISTO DE ALMEIDA FANTINATTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

**Botucatu/SP
2011**

AGRADECIMENTOS:

O pior erro seria não começar pela minha família. Agradeço imensamente aos meus pais (Marisa e Erivelto) pois apesar de todas as dificuldades (que nunca foram poucas), nunca me negaram ajuda quando precisei. Sempre compreenderam minhas vontades e sonhos e me incentivaram a alcançá-los, por mais impossíveis que fossem. É evidente que sem eles eu não poderia ter realizado algo como esse trabalho. Levarei para sempre tudo o que aprendi com eles. Confiança, força e amor depositados por eles foram fundamentais para isso. Amo vocês!

Agradeço a meu grande irmão, amigo e futuro papai (Thiago) que sempre manteve comigo uma estreita relação e me proporcionou inúmeras conversas sobre a vida e ciência, enfim, sempre me fez pensar muito. Obrigado!

Agradeço, é claro, ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Martins pela oportunidade, confiança, paciência (muita), ensinamentos e amizade. O aprendizado realizado sob sua orientação foi muito além do escopo desta pesquisa e o crescimento como pessoa foi imensurável. Muito obrigado!

Por medo de esquecer algum, não citarei nomes, mas também gostaria de agradecer a todos meus familiares mais próximos, pois cada um também tem sua contribuição.

A todos meus amigos do laboratório (Danillo, Diogo, Érica, Guilherme, Juliana, Marcos, Pedro, Rafael e Sárah), e aos amigos dos laboratórios vizinhos (Bianca, Éder e Jéssica) por todas as conversas, risadas, broncas (inúmeras) e idéias. Devo a todos eles muito do que sou e do que sei.

Agradecimento especial ao Diogo e ao Guilherme que sempre mantiveram um envolvimento mais próximo no trabalho, e ajudaram de forma essencial para que tudo desse certo.

Aos meus amigos de república, Éder e Renato, por não pensarem duas vezes quando precisei de lugar pra morar.

Aos amigos da época de graduação Ana, Bruno, Priscilla e Rafael, pois eles também têm sua parcela de responsabilidade. Viemos juntos a Botucatu, e todos se ajudaram nos primeiros momentos aqui.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista pela estrutura impecável oferecida para a realização dos trabalhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

Aos docentes e discentes do Departamento de Genética e Departamento de Morfologia pelos trabalhos realizados em conjunto, e pelas disciplinas cursadas.

Tudo foi válido!

Muito obrigado!

RESUMO

Cromossomos B são elementos adicionais encontrados em vários grupos de eucariotos, incluindo plantas, fungos e animais. Apesar de terem sido amplamente estudados, seus mecanismos de origem, evolução e possível função ainda são pouco compreendidos. Para avançar no conhecimento da biologia dos cromossomos B, análises morfológicas e de citogenética clássica e molecular foram conduzidas no peixe ciclídeo africano *Haplochromis obliquidens*, portador de 1 a 2 cromossomos B. As análises de citogenética molecular envolveram a aplicação de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando como sondas elementos transponíveis, fração genômica contendo DNA altamente repetitivo (*C_{ot}-1* DNA), genoma total (*comparative genomic hybridization* - CGH) e cromossomos artificiais bacterianos (BACs) contendo genes/segmentos de DNA da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Os resultados obtidos pelas análises morfológicas mostraram que os animais com cromossomo B apresentam níveis menores de variação em comparação aos animais sem cromossomo B, sugerindo uma possível vantagem adaptativa aos portadores de tais elementos visto que a escolha dos machos pelas fêmeas é de caráter visual. O mapeamento das várias sondas contendo DNA repetitivo evidenciou similaridades entre o cromossomo B e o primeiro par cromossômico, sugerindo sua possível origem a partir deste cromossomo do complemento A. No entanto, uma atenção especial é necessária em relação a esta abordagem, frente ao alto dinamismo evolutivo que governa as regiões cromossômicas ricas em DNAs repetitivos, o que pode gerar interpretações de falsa homologia entre cromossomos.

ABSTRACT

B chromosomes are additional chromosomal elements found in a diversity of eukaryote groups from fungi to animals. Despite B chromosomes have been widely studied, their mechanisms of origin, evolution and possible function are still remaining to be clearly understood. To advance in the knowledge of B chromosome biology, morphological analysis, classical and molecular cytogenetics analysis based on fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with transposable elements, repeated DNA genomic fraction (*Cot*-1 DNA), whole genome probes (comparative genomic hybridization - CGH) and BAC clones from *Oreochromis niloticus* were conducted in the cichlid fish *Haplochromis obliquidens* which harbor 1 to 2 B chromosomes. The results obtained evidences that the 1B animals present less morphological variation compared to the 0B animals. The mapping of several probes containing repeated DNAs evidence similarities between the B chromosome and the 1st chromosome pair suggesting its possible origin from this A chromosome. On the other hand, a special attention must be exercised because the high evolutionary dynamism that rules the chromosomal regions harboring repeated DNA clusters may generate a false idea of homology between chromosomes.

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
1.1. Os peixes ciclídeos como modelo de estudo.....	8
1.2. DNAs repetitivos e seus possíveis efeitos no genoma.....	9
1.3. <i>Cromossomos supernumerários</i>	14
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. <i>Animais e amostragem</i>	21
3.2. <i>Realização de medições morfológicas</i>	21
3.3. <i>Extração de DNA genômico</i>	22
3.4. <i>Obtenção de cromossomos mitóticos</i>	23
3.5. <i>Análise do cariótipo da espécie H. obliquidens</i>	24
3.6. <i>Isolamento de fração C₀t-1 DNA</i>	25
3.7. <i>Isolamento de sequências repetitivas por meio de PCR</i>	27
3.8. <i>Obtenção de Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) para serem utilizados como sondas cromossômicas</i>	28
3.9. <i>Comparative Genomic Hybridization (CGH)</i>	28
3.10. <i>Marcação das sondas</i>	29
3.11. <i>Hibridação in situ fluorescente (FISH) e detecção dos sinais</i>	30
3.12. <i>Aquisição de imagens e processamento dos dados</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Os peixes ciclídeos como modelo de estudo

Inserida na ordem dos Perciformes - considerada a maior ordem existente de vertebrados - encontram-se os peixes da família Cichlidae, possuindo mais de 3.000 espécies (Kocher, 2004). A família Cichlidae encontra-se dividida em 4 sub-famílias: Etroplinae, Ptychochrominae, Pseudocrenilabrinae e Cichlinae. A sub-família Cichlinae, por sua vez, é dividida em várias tribos, sendo elas Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini. A espécie em questão, *Haplochromis obliquidens*, encontra-se inserida na sub-família Pseudocrenilabrinae (Smith et al. 2008) originária do continente africano. Outras sub-famílias (Cichlinae, Etroplinae e Ptychochrominae) são características da região Neotropical, Índia e Madagascar, e Madagascar, respectivamente. Os ciclídeos africanos podem ainda ser divididos em três grandes grupos (pelmatochromine, haplochromine e tilapiine), mas que não são reconhecidos como unidades taxonômicas válidas (Lowe-McConnell, 1991).

A grande diversidade de ciclídeos presente nos grandes lagos africanos chama atenção de cientistas, pois acredita-se que aproximadamente 2.000 espécies tenham evoluído nos últimos 10 milhões de anos (Kocher, 2004), o que caracteriza esta família como um importante grupo para estudos evolutivos. Além de tal importância, os peixes desta família também são bastante apreciados para alimentação, pesca esportiva e aquarofilia, sendo a espécie *Oreochromis niloticus* a mais apreciada para consumo, as espécies do gênero *Cichla* (comumente denominadas "Tucunarés") apreciadas para

consumo e pesca esportiva, e as de pequeno porte, por apresentarem coloração marcante, são apreciadas para aquarofilia.

Alguns grupos de ciclídeos podem suportar condições extremas em variados ambientes, como por exemplo, *Oreochromis alcalicus grahami*, que suporta viver em águas extremamente salinas com pH de até 10,5 ou extremamente quentes como em lagoas próximas ao lago Magadi (Kênia) (Maina, 2000). Essa grande resistência a habitats extremos é responsável pela alta radiação adaptativa de membros desta família aos ambientes dos lagos africanos.

O cuidado parental, geralmente desempenhado pelas fêmeas, e a presença de uma "quebra" na linha lateral, representam características marcantes nos peixes desta família (Britski, 1972).

Grande parte das informações genéticas da família Cichlidae é concentrada na espécie *O. niloticus*, e para as outras espécies, as informações são em sua maioria restritas a análises de citogenética clássica como por exemplo a determinação de número diplóide, embora alguns estudos mais atuais têm trazido mais informações acerca da composição e organização genômica de espécies esta família, como visto em Mazzuchelli e Martins (2009), Teixeira et al. (2009), Valente et al. (2011). O número diplóide dos ciclídeos está relacionado com a distribuição geográfica das espécies pelos vários continentes onde são encontrados. Os ciclídeos africanos apresentam número diplóide modal igual a 44 e os da região neotropical apresentam número modal como sendo 48 (Feldberg et al. 2003; Poletto et al. 2010b).

1.2. DNAs repetitivos e seus possíveis efeitos no genoma

Sequências de DNA repetitivo estão presentes em um imenso número de espécies eucariotas. Estima-se que o genoma humano é constituído por até 50% de DNA repetitivo (The Genome International Sequencing Consortium, 2001). A diferença no tamanho apresentada pelos genomas entre diferentes espécies é geralmente associada à grande quantidade de DNA repetitivo presente, incluindo elementos transponíveis, que atuam como grandes responsáveis por alterações genômicas, resultando em rearranjos cromossômicos e ampla variedade de cariótipos (Lönnig e Saedler, 2002; Raskina et al. 2008).

Os elementos repetitivos apresentam presença massiva nas regiões heterocromáticas, pericentroméricas e teloméricas dos genomas, porém podem ser encontradas em algumas regiões eucromáticas. Um exemplo clássico de DNA repetitivo se refere ao DNA satélite alfa centromérico de aproximadamente 170 pares de bases (pb), presente na maioria das espécies de primatas, e que tem participação na função centromérica (Therman e Susman, 1996). Além disso, os DNAs repetitivos também estão envolvidos em vários processos, como por exemplo, na recombinação (Biet et al. 1999), expressão gênica (Liu et al. 2001), eventos de replicação (Li et al. 2002) e diferenciação de cromossomos sexuais (Charlesworth et al. 2005).

A utilização de sequências repetitivas têm se mostrado de extrema importância para estudos evolutivos e cromossômicos (Ferreira et al. 2007) onde seu mapeamento citogenético pode ajudar a esclarecer eventos de amplitudes cromossômicas como fusões, fissões e inversões, e até mesmo podem ser utilizadas para esclarecer a origem de cromossomos supernumerários e diferenciação de cromossomos sexuais.

Incluindo sequências dispersas, famílias multigênicas e sequências distribuídas *in tandem*, várias são as formas de classificação dessas sequências repetitivas (Figura 1). Sequências *in tandem* – aquelas dispostas continuamente - são divididas em três grupos com diferentes tamanhos e distribuições no genoma, sendo eles os DNAs satélites, minisatélites e microsatélites.

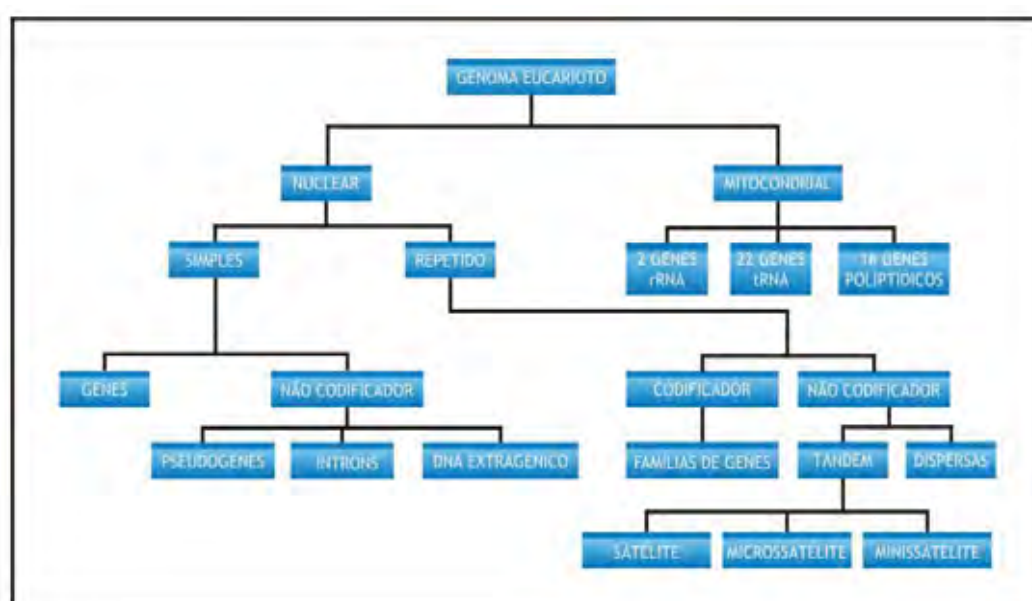


Figura 1: Organização dos tipos de sequências em genomas de eucariotos. Fonte: DNA segredos e mistérios (Farah, 2007).

Sequências de DNAs satélites são as sequências que apresentam de 1.000 a mais de 100.000 cópias de trechos de 100 a 300bp repetidas em tandem, localizadas normalmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas e compreendem um importante componente da heterocromatina constitutiva (Miklos, 1985).

Os minisatélites consistem em curtas sequências compreendendo entre 5 a 65 bp, apresentando riqueza em conteúdo GC e sendo concentrados em

regiões eucromáticas em todos os genomas (Charlesworth et al. 1994). A intensa dinâmica evolutiva dos minisatélites levando a um aumento no nível de variação, permitiu a utilização destas regiões para a eficaz identificação de indivíduos, técnica que ficou conhecida como *fingerprint* de DNA (Jeffreys et al. 1985).

Outro tipo de DNA repetido, os microsátélites, são formados por pequenas sequências que compreendem de 1 a 6 bp repetindo-se *in tandem* e formando arranjos curtos no genoma de menos de 300 pb. Comparando as taxas de mutação que ocorrem entre essas regiões e regiões codificantes, é observado um aumento extremamente considerável variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração para os microsátélites (Ellegren, 2000) a aproximadamente 10^{-9} para regiões codificantes (Li, 1997). Microsátélites são extremamente polimórficos, apresentando diferentes disposições em se tratando da sequência de repetições que podem ser dispostas em mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos. Parte da classificação dos microsátélites também é baseada no fato de um *motif* não possuir alguma interrupção por um outro (sendo denominados microsátélites perfeitos); ser interrompido por outro tipo de sequência (compreendendo os microsátélites imperfeitos); ou ainda uma junção de dois ou mais *motifs* diferentes (denominados microsátélites compostos).

Outros dois grandes grupos de elementos repetitivos são os elementos transponíveis: Transposons e Retrotransposons os quais já possuem diversas famílias identificadas. Tais elementos correspondem a sequências de DNA capazes de se movimentar de uma região para outra do genoma por meio de processos diferentes, que os distingue em dois grupos – os elementos

transponíveis de classe I ou retrotransposons e os elementos transponíveis de classe II ou transposons de DNA.

Os elementos transponíveis foram descobertos em 1950 por Bárbara McClintock por meio de estudos em milho, o que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1983 após a identificação dos elementos transponíveis em diversas outras espécies como *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans* e *Homo sapiens* (Berg e Howe, 1989).

Elementos transponíveis representam aproximadamente 45% do genoma humano, 60% do genoma do milho e 40% do genoma de camundongo e estão também presentes em organismos unicelulares (apesar de estarem em menor quantidade) correspondendo, por exemplo, a 3-5% do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, e aproximadamente 0,3% do genoma de *E. coli* (Biémont e Vieira, 2006).

A classe I de elementos transponíveis compreende os retrotransposons, cuja principal característica se assemelha aos retrovírus, sendo transpostos por intermédio de moléculas de RNA, convertidas em DNA pela transcriptase reversa produzida por estes próprios elementos. Outras características dividem a classe I ainda em dois grupos: os retrotransposons com LTR (longas repetições terminais – *long terminal repeats*) e os transposons sem LTR (*non-LTR*) (Capy et al. 1998).

Os retrotransposons com LTR possuem longas repetições em suas duas extremidades que são necessárias para a transcrição e inserção do elemento em outros locais do genoma (Böhne et al. 2008). Existem três principais grupos em vertebrados: Ty1-copia, Ty3-gypsy e BEL. Os retrotransposons sem LTR são divididos em outros dois grupos: SINEs (*short interspersed nucleotide*

elements) e os LINEs (*long interspersed nucleotide elements*). Diferentemente dos LINEs, que possuem seus próprios mecanismos para efetuar sua transposição, os SINEs são elementos que não possuem tais mecanismos, e utilizam toda a maquinaria de transposição dos LINEs (Smit, 1996).

A classe II de elementos transponíveis compreende os elementos chamados transposons de DNA. São também divididos em várias famílias, onde a separação destas baseia-se na similaridade de suas sequências. O mecanismo de transposição pode variar de um grupo para outro, onde o mecanismo mais conhecido é o “cortar e colar” em que o elemento se transpõe através de cópias que são criadas e assim inseridas em outros locais no genoma.

1.3. Cromossomos supernumerários

Cromossomos B ou supernumerários são cromossomos extras presentes em 10-15% das espécies eucariotas (Camacho et al. 2000; Camacho, 2005). Uma vez que estão presentes em uma pequena parcela dos indivíduos, sugere de uma forma ampla que não são essenciais ao desenvolvimento dos mesmos. Apresentam geralmente uma morfologia distinta dos outros cromossomos do genoma onde se encontram e parecem estar ausentes nas aves, já que esse grupo apresenta inúmeros micro cromossomos em seu cariótipo, o que dificulta a observação e análise dos elementos B (Kasahara, 2009).

Os indivíduos que portam tais cromossomos têm seu genoma dito “hospedeiro”, pois possuem a presença de um elemento supernumerário que muitas vezes é chamado de “parasita” (Camacho et al. 2000). Podem causar

efeitos deletérios quando presentes em grande quantidade em um mesmo indivíduo, como visto em centeio, onde quanto mais cromossomos B presentes, menos o hospedeiro se desenvolve (Jones et al. 2008). Por outro lado, podem causar efeitos aparentemente benéficos no hospedeiro mesmo presentes em grande quantidade, como visto no camundongo *Apodemus flavicollis* (Zima et al. 2003), onde a presença de grande número de cromossomos B proporciona um aumento na massa corpórea conferindo maior adaptabilidade a baixas temperaturas.

A presença de tais cromossomos pode ser também diferenciada por regiões geográficas, onde temos como exemplo o gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* - amplamente estudado na área de cromossomos supernumerários - que apresenta vários tipos de cromossomos B espalhados por diferentes populações de diferentes localidades (Camacho, 2005). Como a presença dos cromossomos B pode afetar a taxa de recombinação entre os cromossomos do complemento A, isso leva a pensar que os cromossomos do complemento A agem contra os efeitos dos cromossomos B através de variantes que possam evitar que os cromossomos B se estabilizem no genoma, ou até mesmo fazendo com que ele acabe por desaparecer completamente. Porém, como os cromossomos B apresentam também uma taxa de alteração em seu conteúdo, podem surgir variantes genéticas que acabam por contornar o ataque desempenhado pelo complemento A (Camacho et al. 2000), fazendo assim com que o cromossomo B permaneça no genoma (Figura 2).

Tais cromossomos também apresentam diferentes níveis de parasitismo, causando assim variados níveis de efeitos no genoma que são observados através de diferença entre os níveis de quiasmas entre grupos de diferentes

regiões (Camacho et al. 2002; Camacho, 2005). Além de apresentarem variações populacionais, os cromossomos B também podem apresentar diferenças numéricas dentro de um mesmo indivíduo, como visto no roedor *Akodon montensis* (Kasahara, 1982).

Por conta de suas estratégias para aumentar a taxa de transmissão – que excede os 50% previstos pela teoria mendeliana – e consequentemente mantendo-se no genoma, esses cromossomos são chamados de elementos parasitas (Camacho et al. 2000). De fato, foi observado que o cromossomo B tem uma tendência maior de, durante a gametogênese em fêmeas, migrar para o oócito secundário em vez de para o primeiro corpúsculo polar, como observado em várias espécies de plantas e animais (Camacho et al. 2000).

Como relatado por diversos trabalhos, estes cromossomos podem ser encontrados em diferentes números em uma única espécie ou ainda de diferentes formas na mesma espécie (Trifonov et al. 2002; Szczerbal e Switonski, 2003; Moreira-Filho et al. 2004). Estes cromossomos não realizam recombinações entre eles mesmos quando presentes em duplicidade, nem com outros cromossomos do complemento A, embora existam evidências de que recombinações ocorram em cromossomos B da raposa *Vulpes vulpes* como relatado por Basheva et al. (2010).

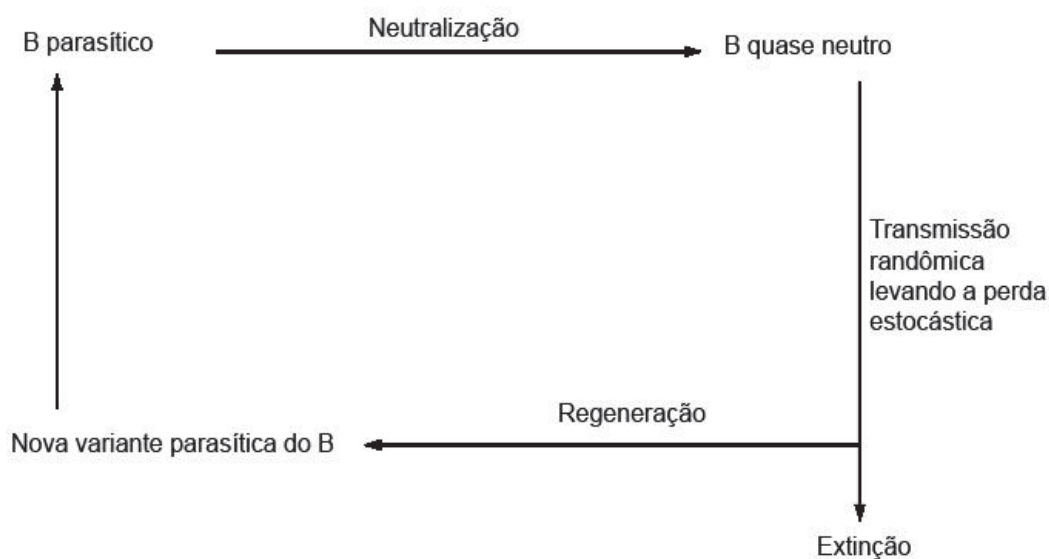


Figura 2: Ilustração do ciclo de parasitismo dos cromossomos B no gafanhoto *E. plorans* (modificado de Camacho et al. 2000).

Tais cromossomos possuem uma ampla variedade de processos de surgimento. Um modo de detectar o surgimento de um cromossomo B é pela verificação de sequências compartilhadas entre o B e o genoma A (Beukeboom, 1994). Se sequências são compartilhadas, pode tratar-se de uma forma intra-específica (aquela quando o cromossomo B é originado por segmentos do próprio genoma em que se encontra) ou ainda de forma inter-específica, quando verifica-se que dado cromossomo B é originado a partir de uma espécie próxima (Sapre e Deshpande, 1987; Scharl et al. 1995; McAllister e Werren, 1997). Origens inter-específicas são geralmente detectadas quando são encontradas no cromossomo B sequências que estão ausentes no complemento A da espécie hospedeira, porém presentes no genoma de uma espécie próxima que não possui Bs (McAllister e Werren, 1997). Quando originados de forma intra-específica, podemos diferenciar tal surgimento como sendo de caráter autossômico (no caso, surgido dos cromossomos autossomos

– sendo esta, a forma mais aceita) ou ainda um surgimento através dos cromossomos sexuais.

Muitas variações podem ocorrer em se tratando de tamanho, onde os cromossomos B podem ser tão pequenos quanto um simples ponto, sendo também chamados de "dot-like", como observado no mamífero *Apodemus penisulae* (Trifonov et al. 2002), tão grandes quanto os cromossomos do maior par como visto em *Astyanax* (Maistro et al. 1992) e *Haplochromis obliquidens* (Poletto et al. 2010a), e até mesmo chegando a ser considerados gigantes genômicos e apresentando tamanhos superiores que os maiores cromossomos do complemento A, como visto no peixe *Alburnus alburnus* (Ziegler et al. 2003) que pode medir até 1.5x o tamanho do maior par cromossômico do complemento A. Esses cromossomos são em sua grande maioria completamente heterocromáticos e enriquecidos com elementos repetitivos, incluindo elementos transponíveis, DNAs ribossomais e DNAs satélites.

Dentro do grupo dos ciclídeos, cromossomos supernumerários já foram detectados em algumas espécies sulamericanas, sendo elas *Gymnogeophagus balzanii* (Feldberg e Bertollo, 1984), *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis*, *Crenicichla niederleinii* (Martins-Santos et al. 1995), *Cichla monoculus*, *Cichla sp.* e *Crenicichla reticulata* (Feldberg et al. 2004). *Haplochromis obliquidens* e *Metricalima lombardoi* são as únicas espécies africanas desta família em que cromossomos supernumerários foram detectados até o momento. Além de serem encontrados apresentando-se completamente heterocromáticos, cromossomos B em ciclídeos também são encontrados em números variados, sendo de 1 a 2 em *H. obliquidens* (Poletto et al. 2010a) e de 1 a 3 em *Cichla monoculus*, *Cichla sp.* e *Crenicichla*

reticulata (Feldberg et al. 2004). A família Cichlidae compreende um importante grupo de peixes com importância tanto para pesca e consumo como por exemplo *Oreochromis niloticus* (comumente denominados tilápias) e *Cichla kelberi* (comumente chamados de tucunarés), quanto para aquariofilia por conta das inúmeras espécies que apresentam coloração exuberante, como por exemplo os peixes do gênero *Symphysodon*, também conhecidos como acarás. O sequenciamento completo do genoma de várias espécies de ciclídeos juntamente com dados citogenéticos são de extrema importância para a elucidação dos mecanismos por trás da origem e evolução de cromossomos supernumerários em peixes desta família.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo a análise do cromossomo B da espécie de ciclídeo africano *Haplochromis obliquidens* pela utilização de técnicas de citogenética clássica e molecular, visando compreender melhor sua organização genômica e relação com o complemento A, assim como os possíveis efeitos da sua presença nos indivíduos portadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e amostragem

Foi utilizada a espécie de ciclídeo africano *Haplochromis obliquidens* (Figura 3), amplamente difundida na aquariofilia, como modelo de estudo para conduzir a presente proposta de pesquisa. Esta espécie é natural dos lagos Kyoga e Nawampasa (lagos satélites ao lago Vitória) e está considerada extinta no primeiro e ameaçada de extinção no segundo lago (Steeves et al. 2010). Os animais utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de lojas de aquariofilia da cidade de Botucatu/SP. Após preparações cromossômicas e retirada de tecidos para extração de DNA, os exemplares foram fixados em formol 4% e estocados em etanol 70% na coleção do Laboratório Genômica Integrativa (LGI) - Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.



Figura 3: Exemplar adulto (macho) de *Haplochromis obliquidens*.

3.2. Realização de medições morfológicas

Foram realizadas medições morfológicas em 24 exemplares de *H. obliquidens* (amostragem contendo indivíduos com e sem B) com a finalidade de verificar se a presença do cromossomo B leva a alterações na forma do

indivíduo. As medições foram realizadas utilizando um paquímetro digital. De acordo com Trapani (2003) foram considerados 5 caracteres: Comprimento total (*TL*), comprimento predorsal (*PDL*), diâmetro do olho (*EW*), comprimento do focinho (*SL*) e comprimento pósorbital (*POL*) (Figura 4).

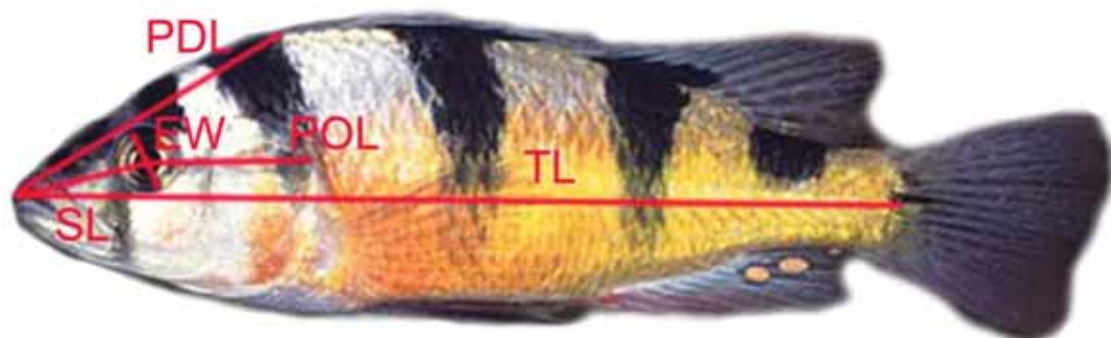


Figura 4: Ilustração dos caracteres utilizados nas análises morfológicas.

3.3. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de fígado fixado em etanol 100% utilizando o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook e Russel (2001) que consiste nos seguintes passos:

- 1- Macerar o tecido em um tubo;
- 2- Adicionar 500µL de tampão de digestão (Tabela 1);
- 3- Aquecer as amostras em banho-maria a 50°C por aproximadamente 1 hora (h) e 30 minutos (min), até que haja uma boa digestão do tecido;
- 4- Adicionar 500µL de fenol-clorofórmio e homogeneizar as amostras durante 15min;
- 5- Centrifugar por 15min a 15.000 rotações por minuto (rpm);
- 6- Transferir o sobrenadante para um segundo tubo;

- 7- Acrescentar 0,2 do volume total da reação de NaCl 1M e dois volumes de etanol 100% gelado. Agitar suavemente de modo a precipitar o DNA;
- 8- Centrifugar por 5min a 15.000rpm;
- 9- Descartar o sobrenadante e acrescentar cuidadosamente 375μL de etanol 70% para lavar;
- 10- Centrifugar por 15min a 15.000rpm;
- 11- Descartar o sobrenadante e secar o DNA (temperatura ambiente ou estufa até 40°C);
- 12- Eluir as amostras com 250μL de água ultrapura.

Tabela 1: Componentes para tampão de digestão de tecido e suas respectivas concentrações e volumes iniciais (C1 e V1) e finais (C2 e V2).

Componente		C1	V1	C2	V2
para cada amostra	H ₂ O qsp 500μL	----	430μL	----	500μL
	NaCl	5M	10μL	0,1M	500μL
	Tris-HCl	1M	5μL	0,01M	500μL
	SDS	10%	25μL	0,50%	500μL
	Proteinase K	10mg/mL	5μL	0,1mg/mL	500μL
	EDTA	0,5M	25μL	0,025M	500μL

3.4. Obtenção de cromossomos mitóticos

Preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas em trabalhos anteriores (Poletto et al. 2010a, 2010b) e encontravam-se estocadas a -20°C no LGI. Preparações adicionais também foram obtidas com base na metodologia descrita por Bertollo et al. (1978) de modo aumentar a amostragem anterior. Foram seguidos os seguintes passos:

- 1- Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 0,1mL para cada 100 gramas (g) de peso do animal;

- 2- Deixar o animal em aquário bem aerado por cerca de 40min. Em seguida, anestesiá-lo e sacrificar o animal para retirar a porção anterior e posterior do rim, transferindo-o para uma solução hipotônica de KCl 0,075M;
- 3- Divulsionar o tecido com a ajuda de uma seringa de vidro e transferir o sobrenadante para um tubo de 12mL;
- 4- Incubar o material obtido em estufa a 37°C por aproximadamente 23min;
- 5- Pré-fixar o material com 6 gotas de fixador Carnoy (metanol:ácido acético – proporção 3:1) e ressuspender o material pipetando-o por aproximadamente 100 vezes;
- 6- Deixar descansar por 5min, e adicionar fixador até completar o tubo realizando então uma outra ressuspensão;
- 7- Centrifugar a 800rpm por 10min e descartar o sobrenadante, completando com mais 6mL de Carnoy seguido de outra série de pipetagem;
- 8- Centrifugar a 1.000rpm por 10min, descartar o sobrenadante, completar para 6mL de Carnoy, repetindo este passo por mais duas vezes;
- 9- Após a última lavagem, ressuspender o material com Carnoy até que a amostra se apresente turva, e estocar este material a -20°C;
- 10- Para preparação das lâminas, pingar 20µL em uma lâmina pré aquecida em água destilada a 60°C deixando secar ao ar.

3.5. Análise do cariótipo da espécie *H. obliquidens*

Para obtenção de um melhor padrão cariotípico foi utilizado o método de cálculo de Índice Centromérico [$ic = 100p / (p+q)$], onde p e q representam braço menor e braço maior, respectivamente). Foram montados 9 cariótipos a partir de metáfase submetidas à coloração convencional com Giemsa de três indivíduos diferentes, os quais foram submetidos a medições realizadas com o software Image Pro® Plus (Media Cybernetics). Tais medições consistiram em calcular o índice centromérico de todos os cromossomos. Considerando 22 pares para cada um dos 9 cariótipos, foram criadas 198 tabelas representando cada um dos pares cromossômicos onde foram adicionados os dados referentes aos comprimentos de cada braço dos dois homólogos.

De modo a verificar se existem diferenças morfológicas entre dois cromossomos B quando presentes em duplicidade em uma mesma célula foram realizadas medições comparativas entre 26 metáfases de um mesmo indivíduo. Para efeitos de análise comparativa, dois pares do complemento A facilmente identificáveis (par 1 e par 8) também foram medidos.

3.6. Isolamento de fração C_{ot} -1 DNA

Em acordo com a cinética de reassociação de DNA (Zwick et al. 1997), a fração C_{ot} -1 DNA foi obtida baseando-se no seguinte protocolo descrito por Ferreira e Martins (2008):

- 1- Diluir o DNA genômico a uma concentração de 100-500ng/ μ L em 0,3M NaCl;
- 2- Aliquotar 500 μ L de DNA em tubo de 1,5mL;
- 3- Autoclavar por 30min a 1,4atm/120°C;

- 4- Realizar uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificar os tamanhos dos fragmentos;
- 5- Aliquotar a amostra em três tubos (0, 3 e 5), e desnaturar em termociclador a 95°C por 10min;
- 6- Após a desnaturação, resfriar os tubos em gelo por 10seg, e imediatamente tratar o tubo 0 com S1 nuclease e incubar a 37°C por 8 minutos enquanto os tubos 3 e 5 são incubados a 65°C para realizar a renaturação;
- 7- Após 3 minutos de renaturação, tratar o tubo 3 com S1 nuclease e incubar a 37°C por 8 minutos;
- 8- Após 5 minutos de renaturação, tratar o tubo 5 com S1 nuclease e incubar a 37°C por 8 minutos;
- 9- Logo após o tratamento com S1 nuclease por 8 minutos em cada amostra, congelar os tubos em nitrogênio líquido;
- 10-Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio e inverter várias vezes o tubo suavemente para homogeneizar;
- 11-Centrifugar por 5min a 13.000rpm e transferir a fase aquosa para um segundo tubo;
- 12-Precipitar o DNA com 2,5 volumes de etanol 100% gelado e deixar os tubos a -80°C por 30min;
- 13-Centrifugar por 15min a 15.000rpm a 4°C;
- 14-Secar o *pellet* e eluir em 50µL de água ultrapura cada uma das três frações (0, 3 e 5);

15-Marcas as frações *C₀t*-1 DNA com biotina através da reação de *nick translation* com o kit *Bionick Labelling System* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

3.7. Isolamento de sequências repetitivas por meio de PCR

Os elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, e gene de RNAr 5S foram amplificados por PCR. Para realização das PCRs, foram utilizados os seguintes *primers*: *Rex1f* (5'-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3') e *Rex1r* (5'-TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3'); *Rex3f* (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e *Rex3r* (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') (Volff et al. 1999; Volff et al. 2000); *Rex6f* (5'-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC-3') e *Rex6r* (5'-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G-3') (Volff et al. 2001); 5Sf (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3') e 5Sr (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC-3') (Martins e Galetti, 1999). Estes *primers* têm sido utilizados em vários trabalhos para isolamento dos respectivos fragmentos repetitivos e têm-se mostrado muito eficientes. Após encontrar a temperatura de anelamento mais adequada a cada par de primer, foram seguidos programas específicos para cada fragmento (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: 130ng de DNA; 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1,5mM de MgCl₂; tampão de reação a 1X; 0,8mM de dNTP (0,2mM de cada um dos nucleotídeos); 0,2μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e água ultrapura para um volume final de 25μL.

Tabela 2: Programas de ciclos de PCR utilizados para cada um dos fragmentos amplificados.
Tempo em minutos.

<i>Rex1</i>	<i>Rex3</i>	<i>Rex6</i>	<i>5S</i>
95°C – 5:00	95°C – 5:00	95°C – 5:00	95°C – 5:00
95°C – 1:00	95°C – 1:00	95°C – 1:00	95°C – 1:00
62°C – 1:00	58°C – 1:00	58°C – 1:00	55°C – 1:00
72°C – 1:00	72°C – 1:00	72°C – 1:00	72°C – 1:00
72°C – 5:00	72°C – 5:00	72°C – 5:00	72°C – 5:00
4°C – hold	4°C – hold	4°C – hold	4°C – hold

3.8. Obtenção de Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) para serem utilizados como sondas cromossômicas

Foram utilizados clones BACs contendo segmentos genômicos provenientes de uma biblioteca de *Oreochromis niloticus*. Os BACs selecionados para o estudo foram doados pelo Professor Thomas D. Kocher (*University of Maryland, USA*) e possuem um tamanho variando de 145 a 194kb. Alguns dos BACs utilizados contém genes conhecidos e outros possuem grande quantidade de sequências repetitivas de DNA.

3.9. Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Análises envolvendo experimentos de hibridação genômica comparativa (CGH) também foram conduzidas de modo a verificar se o cromossomo B da espécie em questão apresentava segmentos genômicos relacionados a um dos sexos. DNA genômico de machos (0 e 1B) foram marcados com biotina por meio de *nick translation* com o kit *Bio Nick Labelling System (Invitrogen)* e DNA genômico de fêmeas (0 e 1B) foram marcados com digoxigenina também por *nick translation* com o kit *Dig Nick (Roche)* seguindo respectivamente as especificações dos fabricantes. Num primeiro momento, foram utilizadas as sondas que não possuíam cromossomo B em uma hibridação dupla em

metáfases de machos e fêmeas ambas com cromossomos B (Figura 5A). Num segundo momento, foi realizado o mesmo procedimento utilizando DNA genômico de machos e fêmeas que possuíam 1 cromossomo B (Figura 5B). Foi aplicado nas lâminas uma mistura de hibridação contendo 800ng de DNA genômico (400 ng de cada sexo), cobrindo as lâminas com lamínulas e incubando as lâminas em câmara úmida (2x SSC) a 37°C por 72 horas. Após a hibridação, foram detectados simultaneamente os sinais de biotina (sonda de DNA genômico de macho) com FITC-avidina e os sinais de digoxigenina (sonda de DNA genômico de fêmea) com rodamina. As lâminas foram contracoradas com DAPI diluído em meio de montagem *antifading* (Vector).

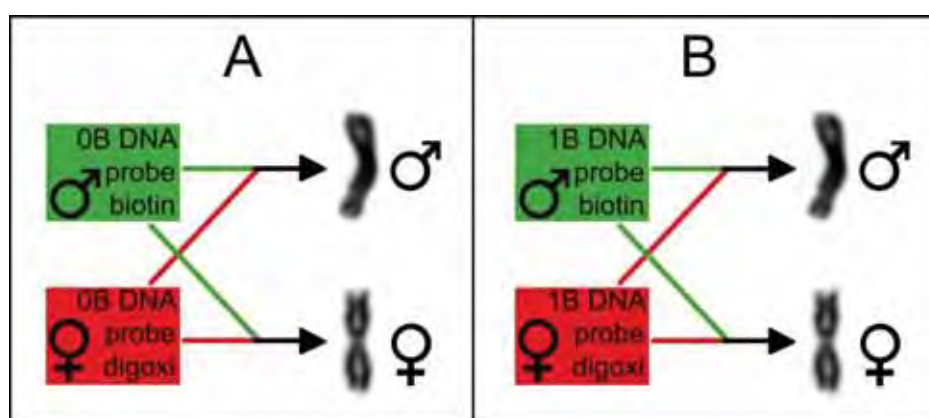


Figura 5: Representação dos experimentos de CGH. Experimentos com sondas genômicas sem cromossomos B (A) e experimentos com sondas genômicas com cromossomos B (B), ambas hibridadas em metáfases de machos e fêmeas com cromossomo B.

3.10. Marcação das sondas

Após a padronização das PCRs para cada um dos pares de primers, foram obtidas as sondas através de PCR utilizando incorporação de dATP biotinilado (*Invitrogen*). As reações de PCR para marcação foram realizadas com os mesmos parâmetros citados no item 3.7, com uma modificação na

concentração de dATP que consistiu em 0,14mM de dATP comum adicionado de 0,06mM de dATP biotinilado (totalizando 0,2mM de dATP) somado a 0,2mM de cada um dos demais nucleotídeos, totalizando os 0,8mM de dNTP na reação. As sondas utilizadas nos experimentos de CGH e *Cot*-1 DNA foram marcadas através da reação de *nick-translation*, utilizando o kit Bionick (Invitrogen) para marcações com biotina, e Dig-nick (Roche) para as marcações com digoxigenina. Os BACs foram marcados utilizando o kit Genome Plex (Sigma).

3.11. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e detecção dos sinais

Após preparadas, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70, 85 e 100%) por 5min cada. Uma mistura de hibridação foi preparada, contendo:

- 3µL da sonda (200ng no total);
- 7,5µL de formamida 100% (concentração final de 50%);
- 3µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final de 10%);
- 1,5µL de 20x SSC (concentração final de 2x).

Os cromossomos foram desnaturados em uma cubeta contendo formamida 70% (70mL de formamida 100% e 30mL de 2x SSC) a 62°C por 39seg. Em seguida, as lâminas foram novamente desidratadas em série alcoólica gelada e secadas posteriormente à temperatura ambiente. A mistura de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10min, deixado em gelo por 5min e foram aplicados os 15µL da mistura sobre a lâmina, cobrindo esta com uma lamínula. As lâminas foram então incubadas em câmara

umedecida com 2x SSC a 37°C *overnight* de modo a realizar a hibridação (para os experimentos de CGH as incubações foram de 72 horas).

Após a hibridação, as lamínulas foram removidas, as lâminas lavadas em 2x SSC a 72°C por 5min e transferidas para uma solução de bloqueio (PBD) à temperatura ambiente de modo a prosseguir à detecção dos sinais. Foram seguidos então os seguintes passos:

- 1- Aplicar uma solução conjugada de FITC-avidina (26µL de tampão C [TC] e 4µL de FITC-avidina), cobrindo-a com lamínula e incubando-a em câmara úmida a 37°C por 20min. (Para detecção de sondas marcadas com digoxigenina, utilizar neste passo 0,25µL de rodanina e 44,75µL de TC pulando diretamente para o passo 6).
- 2- Remover a lamínula e lavar as lâminas duas vezes em PBD a 42°C por 5min cada;
- 3- Aplicar 20µL de solução de anti-avidina (1µL de anti-avidina e 19µL de PBD) cobrir com lamínula e incubar novamente em câmara úmida por 20min;
- 4- Remover a lamínula e lavar novamente as lâminas duas vezes em PBD a 42°C por 5min cada;
- 5- Aplicar novamente uma solução conjugada de FITC-avidina (26µL de TC e 4µL de FITC-avidina), cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida a 37°C por 20min;
- 6- Remover a lamínula e lavar duas vezes as lâminas em PBD a 42°C por 5min cada;
- 7- Montar as lâminas com 15µL de DAPI-*anti fading*.

3.12. Aquisição de imagens e processamento dos dados

As imagens foram adquiridas por meio de microscópio de fluorescência Olympus BX61 com filtros para FITC, Rodamina, DAPI e Iodeto de Propídio, e equipado com câmera digital Olympus DP71. As imagens fotografadas foram processadas através do software Photoshop CS2 (Adobe).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente tópico será apresentado em forma de manuscrito a ser submetido a revista científica da área de genética e citogenética.

Molecular cytogenetic mapping of the B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis obliquidens*: contributions to understanding the genomic content and origin of B chromosomes

Key Words

Supernumerary chromosomes, Transposable elements, Evolution, Cytogenetic, Fluorescent *in situ* hybridization.

Abstract

B chromosomes are additional chromosomal elements found in a diversity of eukaryote groups including fungi, plants and animals. Despite B chromosomes have been widely studied, their mechanisms of origin, evolution and possible function are still remaining to be clearly understood. To advance in the knowledge of B chromosome biology, morphological analysis, classical and molecular cytogenetics analysis were conducted in the cichlid fish *Haplochromis obliquidens* which harbor 1 to 2 B chromosomes. The results obtained evidences that the 1B animals present less morphological variation compared to the 0B animals. The cytogenetic mapping of several probes including transposable elements, repeated DNA genomic fraction (*Cot*-1 DNA), whole genome probes (comparative genomic hybridization - CGH), and BAC clones from *Oreochromis niloticus* containing repeated DNAs, evidenced similarities between the B chromosome and the 1st chromosome pair suggesting its possible origin from this A chromosome. On the other hand, a special attention must be exercised because the high evolutionary dynamism that rules the chromosomal regions harboring repeated DNA clusters may generate a false idea of homology between chromosomes.

Introduction

The B chromosomes (Bs), also known as accessory, extra or supernumerary chromosomes are dispensable chromosomes found in various eukaryotic species including animals, plants and fungi (Camacho et al. 2000). Around 15% of the eukaryote species do carry these chromosomes (Camacho, 2005) which can also be found in different numbers and shapes (Trifonov et al. 2002; Szczerbal and Switonski 2003; Moreira-Filho et al. 2004) in the species. It is broadly reported that Bs are heterochromatic and enriched with repetitive elements such as satellites DNAs, rDNAs and transposable elements (Camacho, 2000). The Bs can arise from an intraspecific origin (from the host genome) or interspecifically (from the genome of a related species) (Sapre and Deshpande, 1987; Scharf et al. 1995; McAllister and Werren, 1997). When Bs are intraspecifically originated, they can also be differentiated by an autosomal origin - the most accepted form - or from the sex chromosomes. The size of the Bs can also vary extremely, ranging from a simple dot-like chromosome (Trifonov et al. 2002) to as big as the bigger chromosome pair of the A complement (Maistro et al. 1992; Ziegler et al. 2003; Poletto et al. 2010a).

The number of Bs in the host cells can affect the fitness of the carrier organism (Jones et al. 2008) and its presence may also affect the recombination rate among homologous chromosomes of the A complement (Camacho, 2005). They present non-Mendelian inheritance and meiotic analysis of these chromosomes reveals no recombination with any other chromosomes of the A complement nor with other Bs when they are in duplicity (Camacho, 2005), although there are evidences of B chromosome recombination in the fox *Vulpes vulpes* (Basheva et al. 2010). Although the

presence of B chromosomes has been extensively described for a huge number of species, several questions concerning its origin, evolutionary mechanisms and function, are still remaining to be answered.

B chromosomes were describe in the African cichlid *Haplochromis obliquidens* that was found to harbor one or two large heterochromatic B chromosomes, including both male and female (Poletto et al. 2010a). Among Cichlidae members, B chromosomes were also identified in the African species *Metriaclima lombardoi* (Poletto et al 2010b) and in the South American species *Gymnogeophagus balzanii* (Feldberg and Bertollo, 1984), *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis*, *Crenicichla niederleinii* (Martins-Santos et al. 1995), *Cichla monoculus*, *Cichla sp.* and *Crenicichla reticulata* (Feldberg et al. 2004). The cichlids have attracted the attention of biologists due the rapid radiation of some groups in the Great Lakes of East Africa, in which almost 2.000 species arose in the last 10 million years (Kocher, 2004). In addition, some species of Cichlidae, principally the tilapiines, are very important for aquaculture and fisheries, and the Nile tilapia represents one of the most widely farmed freshwater fish in the world (FAO, 2008). Because of this, the cichlids have become an important model for genetics, genomics and evolutionary studies. Here, we investigated the genomic composition of the B chromosome of *H. obliquidens* looking for contributions in relation to the origin and genetic mechanisms that took place during the evolutionary history of this element. In the aim to advance in understanding the B chromosome biology and also to contribute to the knowledge of the complex evolutionary history of African cichlids, molecular cytogenetics was conducted consisting in fluorescent in situ hybridization (FISH) using several classes of probes including (i) the

retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, (ii) 5S rDNA; (iii) BACs from a *Oreochromis niloticus* genomic library; (iv) *Cot-1* DNA, and (v) whole genomic DNA. The results show a straight relationship between the genomic content of the B chromosome and the largest chromosome pair of the A complement (pair one) allowing inferences on the possible evolutionary history of this extra element.

Material and methods

Animal samples and morphological analysis

Specimens of *Haplochromis obliquidens* were obtained from aquarium trade in Botucatu/SP, Brazil. Morphological characters of 22 specimens, comprising 11-0B and 11-1B animals, were measured using a digital paquimeter as follow: TL (total length), POL (post orbital length), PDL (pre dorsal length), EW (eye width) and SL (snout length). The samples were then separated in two groups: (i) 0B specimens and (ii) 1B specimens. The measurements were submitted to correlation analysis between TL and each one of the other characters (TL vs POL; TL vs PDL; TL vs EW and TL vs SL), and the Coefficient of Correlation (R) (Altman, 1991) was calculated for each correlation analysis.

Basic cytogenetic and chromosome morphology analysis

Metaphasic chromosomes were obtained from 96 animals from previous works (Poletto et al. 2010a, 2010b) and new chromosome preparations were obtained in this work (Bertollo et al. 1978) in order to increase the number of analyzed specimens. C-banded chromosome preparation according to Sumner (1972) and Chromomycin A₃ (CMA₃) staining according to Schweizer (1976) where performed. For a better knowledge of the karyotype of the species, measurements were conducted on all chromosomes of nine karyotypes prepared from three different specimens harboring one B chromosome. The data were analyzed according to the centromeric index $[100p / (p+q)]$ to determine the morphology of chromosomes as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) or acrocentric (a).

To verify morphological divergence between double Bs present in the same cell, analysis were carried out based on the measurements of the Bs. In order to find out if size differences between double Bs are also present between homologous of the A complement set, the pair 1 and 8 (easily recognized in the karyotype) were also included in the analysis. *In toto*, three chromosome pairs (Bs, pair 1 and pair 8) of 26 metaphases were measured and each pair (double Bs was analyzed as a pair) was separated in bigger and smaller chromosomes in order to create two groups for analysis. It was calculated the difference between the mean value of the size of the bigger and smaller chromosomes in all the pairs. The measurements were calculated comparing Bs, 1st and 8th pairs from the same metaphase. T-test were also carried out over the measurements of Bs, 1st and 8th pairs.

Cytogenetic mapping

DNA for purposes of probe obtention was extracted according to the phenol-chloroform method following Sambrook and Russel (2001) using liver tissue. Several probes were applied in the cytogenetic mapping of metaphasic spreads, including *Cot*-1 DNA fraction, the retrotransposons *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, 5S rDNA, bacterial artificial chromosomes (BACs) of a genomic library of the Nile Tilapia *O. niloticus* (Cichlidae), and whole genome used as probe for comparative genomic hybridization (CGH) analysis.

The *Cot*-1 DNA fraction was obtained based on the renaturation kinetics (Zwick et al. 1997) with some modifications (Ferreira and Martins, 2008) consisting in digestion by autoclaving 200µL of genomic DNA at 100-200ng/µL in 0.3M NaCl. The fragmentation was verified by electrophoresis in 1% agarose

gel in order to obtain DNA fragments ranging from 100 to 800bp. The DNA was then denatured at 95°C for 10min, cooled on ice for 10sec, and heated up to 65°C for reannealing for 5min. After, the fragmented DNA was then treated with 1U of S1 nuclease at 37°C for 8min in order to digest the single strand DNA, keeping intact the highly and moderately repetitive sequences. The sample was frozen in liquid nitrogen and the DNA extracted with the phenol-chloroform method (Sambrook and Russel, 2001). The probe was labeled with biotin through nick translation (Bionick Labeling System - Invitrogen) and hybridized on 1B metaphasic spreads.

The retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets as follows: *Rex1f* (5'-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC) and *Rex1r* (5'-TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC) designed to amplify *Rex1* segments corresponding to the coding domains 3-7 of the reverse transcriptase (RT) gene (Volff et al. 2000); *Rex3f* (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG) and *Rex3r* (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) that were designed to amplify the coding domains 1, 2, 2A, A and B of the RT gene (Volff et al. 1999); and *Rex6f* (5'-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C) and *Rex6r* (5'-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G) that amplify the C-terminal part of the restriction enzyme-like endonuclease of the retrotransposon element (Volff et al. 2001). PCR was also applied in the obtention of 5S rDNA repeats with the primers 5Sf (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) and 5Sr (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC) (Martins and Galetti, 1999). Firstly, each PCR reaction was standardized and analyzed in a 1% agarose gel in order to get specific products of each primer set. The probes were obtained through PCR labeling with 130ng of genomic DNA, 1U of Taq DNA polymerase,

0.5 μ M of each primer, 1.5mM MgCl₂, 1X Buffer reaction, 0.2mM of each dNTP (where dATP were: 0.14mM of normal dATP and 0.06mM of dATP-biotinilated – comprising a total of 0.2mM dATP) and ultra pure water up to 25 μ L of reaction volume. The PCR obtained DNA probes were then fragmented with DNase to be used on chromosome hybridizations.

Ten BAC clones selected from a genomic library of *O. niloticus* were also applied as probes on the hybridizations on 1B metaphasic spreads (Table 1). The BACs selected belong to the linkage groups (LG) 1, 3 and 5 of *O. niloticus*. Most BACs used as probes were from linkage group 3 and contain markers located in the larger chromosome pair of *O. niloticus* that is homologous to the chromosome 1 of *H. obliquidens* (Poletto et al. 2010b). It was previously demonstrated that chromosome 1 of *H. obliquidens* shares repeated DNAs with the B chromosome (Poletto et al. 2010a). The genomic content of the BACs was estimated based on restriction physical mapping data available (Katagiri et al. 2005) and nucleotide sequence of BACs (Cnaani et al. 2008). BACs were labeled with the kit Genome Plex (Sigma).

Comparative genomic hybridizations (CGH) were carried out in order to observe if the B chromosome of *H. obliquidens* possess sex specific genomic segments. Genomic DNA of a male and female (both without B chromosomes) were used to perform the first round of CGH experiments. In the second round, genomic DNA of male and female containing B chromosomes was used as probes. Genomic DNA probes (0B male, 0B female, 1B male and 1B female) were labeled through nick translation. Male DNA was labeled with biotin (Bionick Labelling System - Invitrogen) and female DNA with digoxigenin (Dig Nick - Roche). Double hybridizations were performed using 400ng of each sex

genomic DNA. In the first part of the experiments, the 0B probes (female [digoxigenin] + male [biotin]) were double-hybridized on a 1B male spread and 1B female spread. In the second part, the 1B probes (female [digoxigenin] + male [biotin]) were double-hybridized also on a 1B male spread and 1B female spread.

For the probe hybridizations, the chromosome spreads were incubated for 3 minutes in a pepsin solution containing 50mL of water, 250 μ L HCl 0.2N and 250 μ L of pepsin 1%. The slides were then washed twice in 2x SSC for 5min each at room temperature, dehydrated in cold ethanol series (70, 85 and 100%) for 3 minutes each and air dried. The chromosomes were denatured in a 70% formamide solution (70mL formamide 100% and 30mL of 2x SSC) at 65°C for 39 seconds followed by another cold ethanol series washes for 3 minutes each and air dried. The hybridization mixture were prepared with 3 μ L of labeled PCR product (100ng), 7.5 μ L of formamide 100% (final concentration of 50%), 3 μ L of dextran sulfate (final concentration of 10%) and 1.5 μ L of 20x SSC (final concentration of 2x). For CGH, the mix was prepared with 3 μ L of male probe (400ng), 3 μ L of female probe (400ng) and the final concentrations of other components were kept. The probe mixtures were then denatured at 95°C for 10 minutes, cooled in ice for 5 minutes, applied on the slides, covered with a cover slip and incubated in a moist chamber (2x SSC) overnight at 37°C (72h for CGH experiments). After hybridization a wash in 2x SSC at 72°C for 5 minutes was conducted and the slides were placed in a PBD solution at room temperature until to address the detection of signals. The detection were performed with a incubation at 37°C with FITC-avidin conjugated in C buffer (0.1M NaHCO₃ and 0.15M NaCl) for 20 minutes, followed by 2 washes in PBD buffer at 42°C for 3

minutes each, a incubation with anti-avidin and PBD buffer at 37°C for 20 minutes, 2 washes with PBD buffer at 42°C for 3 minutes each, a second incubation with FITC-avidin and 2 washes in PBD buffer at 42°C for 3 minutes each. Biotin signals were detected using FITC and digoxigenin signals were detected using rhodamine. The slides were then mounted with antifading containing DAPI and visualized under an Olympus BX61 fluorescence microscope equipped with a CCD camera Olympus DP71. The images were then analyzed and the figures were merged using Photoshop (Adobe).

Results

Morphological analysis of specimens and karyotypes

Morphological analyses were conducted based on the total length (TL) of the fish body versus each one of the other body measurements (POL, PDL, EW and SL) through a correlation plot. The R analyses showed a very close relationship between the specimens in the two groups analyzed (0B and 1B). Nevertheless, despite the low number of animals included in the sample (11-0B and 11-1B animals), there was a small difference between the 0B and 1B group correlations (Table 2). The 1B group shows less morphological variation between each character compared to the 0B one.

Chromosome morphology analysis showed the karyotype is composed of 7 meta/submetacentric chromosomes (m/sm) and 15 subtelo/acrocentric chromosomes (st/a) (Fig. 1) plus one or two B chromosomes. The size of the B chromosomes had an average of 3.35µm comprising 6.48% of the whole genome of the species (Supplementary material 1 and 2).

Comparative analysis of the 2B karyotypes showed higher differences in the size between the 2Bs (when observed in the same cell) than the differences between the members of the 1st and 8th chromosome pairs also in the same cell. The mean difference between the large and the small B was 0.45µm whereas the difference between members of the 1st and 8th chromosome pairs was 0.23µm for both pair members (Supplementary material 3 and 4). The t-test carried out showed significant differences between Bs and no differences between the members of the 1st and 8th pairs (Supplementary material 5).

Basic cytogenetic: C-banding and CMA₃ staining

Heterochromatic blocks were observed in the centromeric region of most A chromosomes, in 1p and in the whole extension of the B chromosome, as observed previously by Poletto et al. (2010a) (Fig. 1). CMA₃ staining detected positive sites on 1p, in the pericentromeric region of pairs 1, 7, 13 and 14, in the short arm of chromosomes 8, 9, 12, 16 and 17, and both pericentromeric and subtelomeric regions of the B chromosome (Fig. 1).

Hybridization of chromosomal probes

The C₀t-1 DNA fraction from a 0B genome generated strong hybridization signals on the pericentromeric region of all chromosomes of the A complement, but no signal was observed in the B chromosomes (Fig. 1).

5S rDNA probe generated signals on the pericentromeric region of 15 chromosomes (pairs 1, 8, 9, 11, 14, 15, 18 and 20). The pair no. 14 presented signals only in one of the homologous whereas no signal was observed on the B chromosome (Fig. 1).

The transposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* hybridized in several chromosome pairs, being most signals dispersed in the chromosomes (Fig. 1) with a more intense clustering in pericentromeric regions. *Rex1* presented dispersed signals in most pairs of the karyotype, with high concentration in the distal portion of 1q, dispersed over the pericentromeric areas of most chromosome pairs, and present in the full extension of the B chromosomes (Fig. 1). *Rex3* was accumulated in the pericentromeric regions, dispersed on pairs 1, 8p, in an interstitial site of 8q, and dispersed on the entire extension of the B chromosomes (Fig. 1). *Rex6* showed dispersed signals in several

chromosomes including the long arm of chromosome 1 and were not detected on B chromosomes (Fig. 1).

Ten selected BAC clones representative of LG 1, 3 and 5 were hybridized against 1B karyotypes of *H. obliquidens* (Fig. 2) giving the hybridization patterns as follow. LG 1: the BAC #5 yielded a strong interstitial signal on 9q and dispersed small signals on 1q and in other chromosomes; the BAC #9 presented a strong pericentromeric signal on chromosome pair 3 and small signals dispersed in some chromosomes. No signal was identified on the B chromosomes with BACs of LG 1. LG 3: the BAC #1 generated dispersed signals on few chromosomes and pericentromeric signals on most chromosomes. Additionally, strong signals dispersed on 1q and 1p were observed and an interstitial site was observed on 8q. No signal was observed on B chromosomes: the BAC #3 gave strong hybridization signals in most pericentromeric regions, strong signals on the whole extension of 1p and 1q, a interstitial block in 8q, and dispersed signals in the entire length of the B chromosome (Fig. 2); the BAC #4 showed one interstitial strong signal on 1q and few small signals in some other chromosomes; the BAC #7 presented dispersed signals over 1q, a strong signal close to the centromer of 1q, and no signal in the B chromosomes; the BACs #8 and #10 showed pericentromeric signals on chromosome 1 and no signal on Bs. LG 5: the BAC #2 showed dispersed signals on most chromosomes, an interstitial site in 8q, dispersed signals in 1q, and absence of signals in the Bs. The BAC #6 generated an interstitial signal in 11q and absence of signals in the Bs.

The CGH experiments evidenced a close relationship between the genomes with and without Bs. In the first analyses, CGH probe from a 0B

genome was hybridized on 1B male and 1B female spreads (Fig. 3). No differences were observed between sexes. The hybridization pattern obtained shows very strong signals on the pericentromeric region of all the chromosomes using both male and female probes in both male and female metaphasic spreads. The B chromosome exhibit very weak signals on the pericentromeric and subtelomeric regions under both probes of male and female genomes. The second analyses of CGH involved 1B male genomic DNA and 1B female genomic DNA as probes hybridized against 1B chromosome samples of both sexes. The results showed the same strong signal patterns on pericentromeric regions of all the A chromosomes, but also yielded strong signals on the full extension of B chromosomes on both male and female spreads and strong signals dispersed on 1p and in the distal portion of 1q.

Discussion

General features of B chromosomes of *H. obliquidens*

The chromosomal set of *H. obliquidens* comprised 44 chromosomes plus one or two heterochromatic B chromosomes as previously observed (Poletto et al. 2010a). The B chromosomes of this species were similar in size to the 1st chromosome pair, occupying 6.48% of the genome. Among fishes, the presence of large Bs were also observed in *Astyanax scabripinnis* (Maistro et al. 1992), *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreata et al. 1993), *Rutilus rutilus* (Hafez et al. 1978), and *Alburnus alburnus* that present the larger B among vertebrates (Ziegler et al. 2003; Schmid et al. 2006).

The comparative analysis of the two Bs (when observed in the same cell) evidenced some level of divergence between their sizes. Variation in the size among members of a chromosome pair is commonly observed probably as a consequence of different degree of chromatin condensation, as here observed for the 1st and 8th chromosome pairs, or as a consequence of genomic gain or loss between homologous. The differences between double B chromosomes are considered significant through the student's t-test. Although the probe hybridizations evidenced the same pattern on both Bs, indicating the same genomic content, it is suggested that both Bs could represent two types of Bs in initial stage of differentiation maybe with variation in the copy content of repeated DNAs.

It is known that the presence of Bs may affect the development and fertility of the host (Jones et al. 2008), and affect even other physiological processes in both animal and plants (Camacho, 2000). The performed morphometric analyses show that the presence of the B chromosome could

drive morphological variations among the animals. Although the morphological analyses evidenced a high correlation (R value close to 1) for all the different measurements (including animals with and without B chromosome), the R values were slightly higher for the B carrying animals, except for two correlations (SL vs EW and POL vs SL) suggesting that the 1B population tend to have a more uniform body shape compared to the 0B group. Despite the low number of animals sampled, is possible that the B chromosome presence on this species may affect the body shape, providing the more homogeneous pattern observed, and consequently giving any type of adaptive advantage to the B carriers. In other organisms, the presence of such elements do causes beneficial or deleterious effects. In maize for instance, the presence of Bs cause a negative variation on growth and in pollen grains development as more Bs are present (Jones, 2008). On the other hand, in *Apodemus flavicollis*, B chromosomes apparently affects the body mass, performing a possible heterotic effect on growth, thus giving better adaptation to the cold winter (Zima et al. 2003) with positive relationship between low temperatures and high number of Bs.

Genomic content and origin of B chromosome

The presence of heterochromatin in the entire extension of the B chromosome of *H. obliquidens* is a common characteristic of Bs among fishes (Pauls et al. 1983; Almeida-Toledo et al. 1992; Venere et al. 1999) though euchromatic Bs were also described (Foresti et al. 1989; Venere et al. 1999). GC rich chromatins were observed both in pericentromeric and subtelomeric regions of the B and in several chromosomes of the A complement, including

short arms of several pairs. The CMA₃ sites seem to be evidencing NORs (nucleolar organizer regions), as observed for several fish karyotypes. The previous cytogenetic mapping of 18S rRNA genes in *H. obliquidens* evidenced rDNA sites in the pericentromeric and subtelomeric regions of the B and in the short arm of three chromosome pairs supporting that this extra chromosome may have originated from these A chromosomes (Poletto et al. 2010a).

The *C₀t*-1 DNA probe of a 0B *H. obliquidens* sample hybridized intensively in the pericentromeric areas of all chromosomes of the A complement in coincidence with heterochromatin blocks but did not generate signals in the B chromosome, indicating that the pool of highly repeated sequences present in the Bs are divergent from that of the A complement. This difference on the pattern of *C₀t*-1 DNA fraction probably is a consequence of the high differentiation rate occurring on Bs as consequence of low selective pressure, compared to the A chromosomes, and absence of recombination between Bs and A chromosomes. On the other hand, the retroelements *Rex1* and *Rex3* hybridized in the entire extension of the B chromosome and also in the A genome. This result suggests that the *C₀t*-1 DNA fraction does not contain the *Rex* elements that are present on the B chromosome, and also do not contain 18S rDNA segments since there are blocks of 18S rDNA on Bs.

The *Rex6* TE was previously detected in various species as *Xiphophorus maculatus*, *Oryzias latipes*, *Fugu rubripes* (Volf et al. 2001) and various cichlid species (Teixeira et al. 2009; Valente et al. 2011) and seems to have a restricted distribution, not being detected in various fish families as Nototheniidae, Bathydraconidae, Channichthyidae and Tetraodontidae (Ozouf-Costaz et al. 2004) and nor in *Homo sapiens* (Volf et al. 2001). Although *Rex6*

is present in *H. obliquidens* genome and is distributed in the A chromosomes in the same fashion of *Rex1* and *Rex3*, it is absent from the B chromosome of *H. obliquidens*. The *Rex6* element could even be present on Bs, but in a very low copy number making then impossible to be detected through the limit of fluorescent in situ hybridization resolution. Considering the absence of *Rex6* in several genomes and also in the B chromosome here investigated, it seems that this TE had a more dynamic behavior compared to the other *Rex* TE being lost or restricted to specific chromosomes or genomes.

CGH assays showed no differences between the genomic content of male and female B chromosome, since the signals obtained showed the same pattern between sexes. The application of 0B genomic probe generates intense signals in the pericentromeric regions, in coincidence with heterochromatic blocks and the *Cot-1* DNA, indicating the presence of a large amount of repetitive DNA based on CGH probe. The pericentromeric and subtelomeric regions of Bs presented a weak but visible signal in both sexes. On the other hand, the 1B genomic probes exhibit the same signal pattern, added by strong signals on the full extension of Bs for both male and female probes in both male and female chromosomes. Strong signals were also observed on 1p and dispersed over the distal portion of 1q in coincidence with the other repetitive probes hybridized.

One important characteristic of the three *Rex* elements was their abundance in the first chromosome pair. Although *Rex6* was not clustered in the B chromosome, the other elements were most enriched in the first chromosome and in the B, suggesting some possible homology of both chromosome elements. To test this assumption, BAC clones of linkage group 3

(BACs #1, #3, #4, #7, #8, #10) that are supposed to occupy the first chromosome pair of *H. obliquidens* (Ferreira et al. 2010) were hybridized in 1B karyotypes. Except the BAC #3 that hybridized intensely in the first pair and in the B chromosome, the other BACs fail to reveal signals located on the B chromosome. BAC #3 hybridization pattern was similar to the pattern previously observed in *H. obliquidens* chromosomes under the hybridization of BACs enriched of repeated DNAs (Poletto et al 2010a).

Other BACs of linkage groups 1 and 5 were also included as probes because they contain single copy sequences and repeated DNAs (Cnaani et al 2008). As expected, the BACs produced signals mainly in the 1st chromosome pair, but there was no high concentration of signals on the distal portion of 1q as seen with BAC #3, *Rex1* and *Rex3*. Only the BAC #4 shows signals on 1q concentrated on an interstitial block and not present in a high concentration on distal portion. Considering that the 1B probe of CGH experiments, the *Rex1* and *Rex3* TE, and BAC #3 probes gave very strong signals on distal portion of 1q and in the B element, we can hypothesize that the distal portion of 1q is the possible source of segments that had participated on B chromosome origin in *H. obliquidens*. On the other hand, the presence of 18S rRNA genes in the B chromosomes suggests it possible origin from the A chromosomes that carries rRNA genes (Poletto et al. 2010a).

Considering the absence of recombination between A and B chromosomes, the sharing of DNA sequences among them could be related to transposition events that does not means homology by origin. In fact the presence of huge amount of repeated DNAs including rRNA gene sequences in the B chromosome make difficult to address strong considerations concerning

the possible origin of the B element, because the high evolutionary dynamism that rules the chromosomal regions harboring repeated DNA clusters generate thousands of paralogous copies in the genome giving a false idea of homology between chromosomes.

The 1st chromosome pair of *H. obliquidens* is considered homologous to the 1st chromosome pair of *O. niloticus* (Ferreira et al. 2010) which is thought to be the sex chromosome pair of this species (Foresti et al. 1993; Carrasco et al., 1999). As seen in the present analysis, there is a sharing of genomic content between the B chromosome and the 1st pair. Although the Bs of *H. obliquidens* occurs both in male and females, we cannot exclude their participation in the drive of sex in this cichlid species. Such assumption will be better addressed though the integration of genomic and cytogenetic analysis of the B chromosome, and also in the advancing of the knowledge on sex determination among cichlids.

Acknowledgements

We thank TD Kocher for providing the BAC clones and F Yang for helpful assistance with BACs hybridization. Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), from Brazil.

References

As referências deste artigo encontram-se reunidas ao final deste volume no item 6 "Referências Bibliográficas".

Tables

Table 1: BAC clones employed as probes for chromosome hybridizations.

BAC ID	Probe ID	Linkage group	Marker	Genomic content
b04TI071O04	BAC #1	3	GM204	Repeated DNAs
b04TI010O22	BAC #2	5		Green opsin
b03TI066P02	BAC #3	3	GM354	Repeated DNAs
b03TI086K09	BAC #4	3	UNH115	Repeated DNAs
b04TI071H11	BAC #5	1	UNH995	Repeated DNAs
b04TI053F24	BAC #6	5		ATPase
b03TI073M01	BAC #7	3	Trp1	
b03TI088C14	BAC #8	3	UNH106	
b04TI008J05	BAC #9	1	CYP19A1	Ovarium aromatase
b03TI067N14	BAC #10	3	GM256	

Table 2: Coefficient of correlation (R) of 0B and 1B specimens. All the R values are closer to 1 in 1B specimens than in 0B specimens, except SL vs EW, and POL vs SL. Total length (TL), pre dorsal length (PDL), eye width (EW), snout length (SL) and post orbital length (POL).

	TL	PDL	EW	SL	POL	
TL		0.85	0.77	0.92	0.83	
PDL	0.99		0.91	0.96	0.87	0B
EW	0.94	0.93		0.90	0.90	1B
SL	0.94	0.97	0.89		0.91	
POL	0.94	0.91	0.95	0.81		

Figures

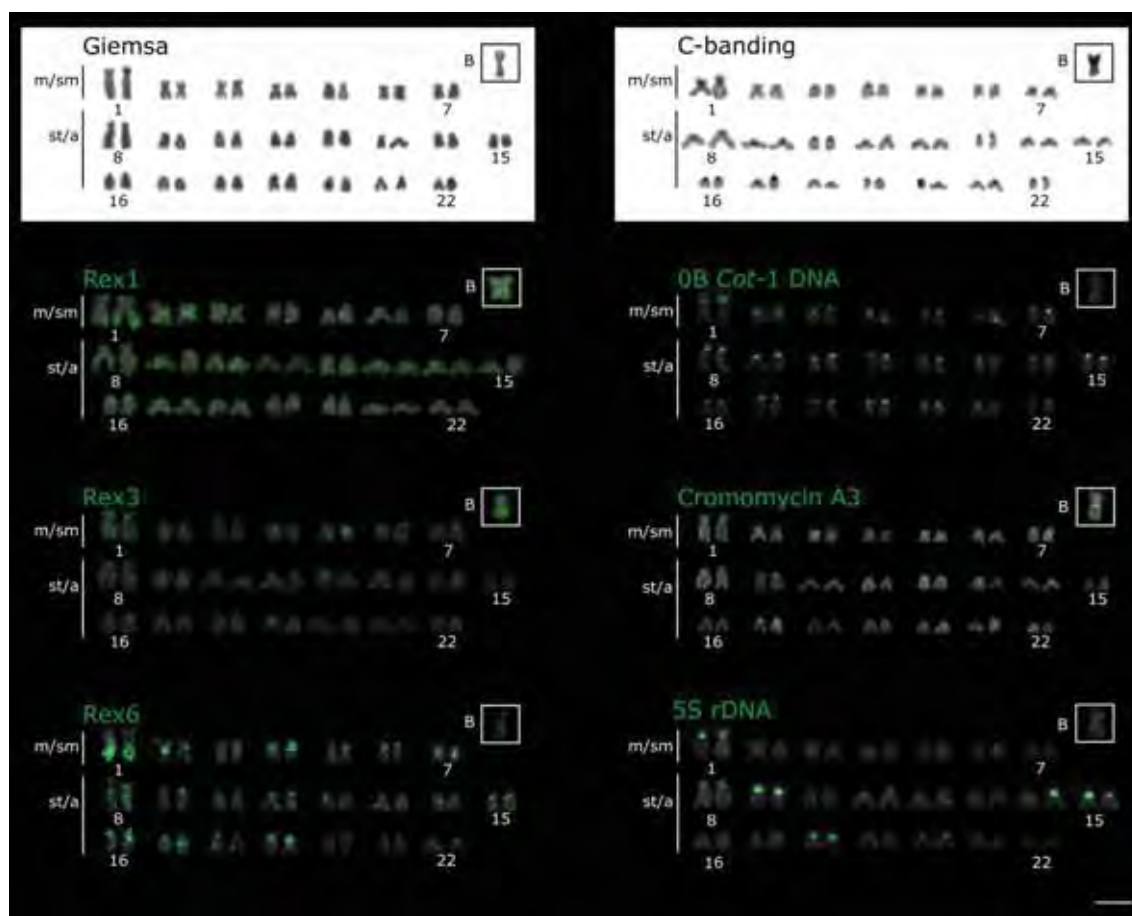


Figure 1: Karyotypes of *H. obliquidens* submitted to Giemsa staining, C-banding and hybridization with retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, *Cot-1* DNA fraction, CMA₃ staining, and 5S rDNA. The B chromosome is showed in the box. Bar indicates 5 μ m.

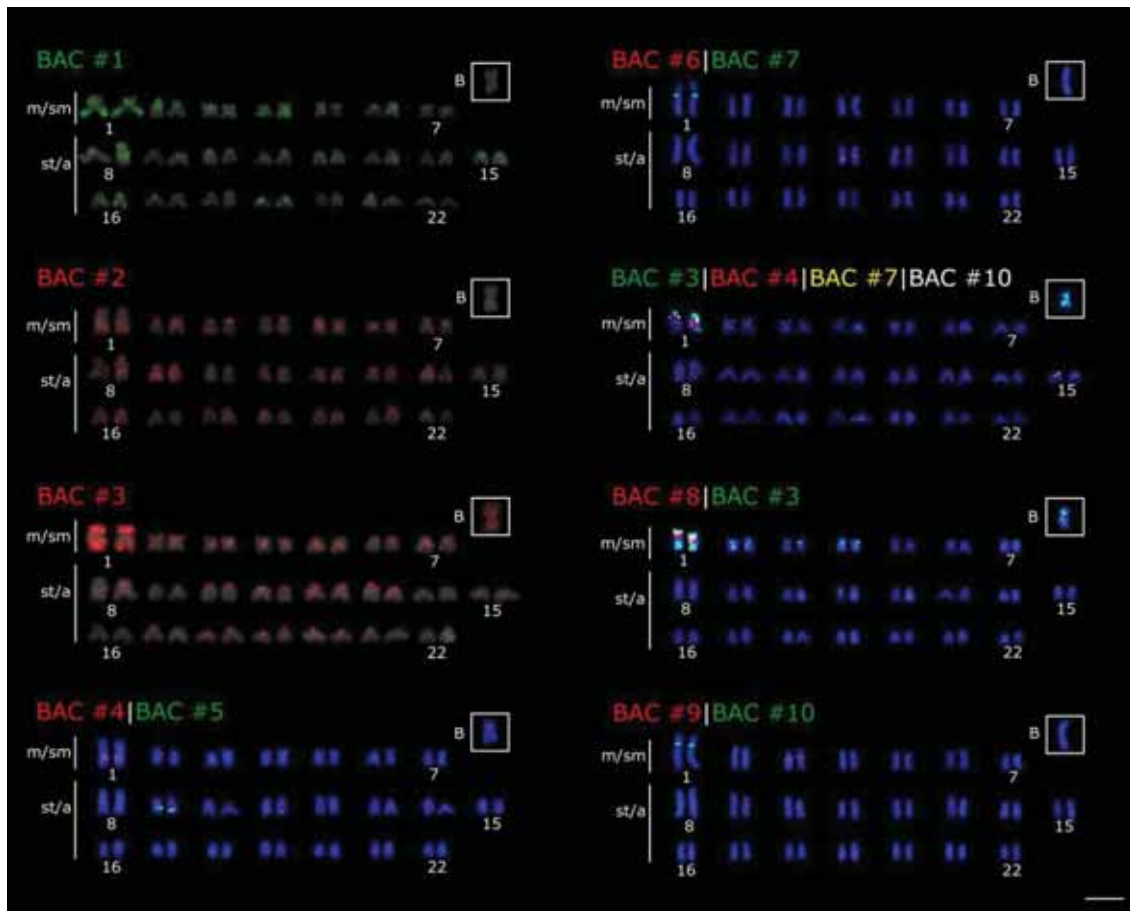


Figure 2: Karyotypes of *H. obliquidens* hybridized to representative BAC clones of linkage groups 1 (BAC probes #5 and #9), 3 (BAC probes #1, #3, #4, #7, #8 and #10) and 5 (BAC probes #2 and #6) *O. niloticus*. The B chromosomes are showed in the box. Bar indicates 5µm.

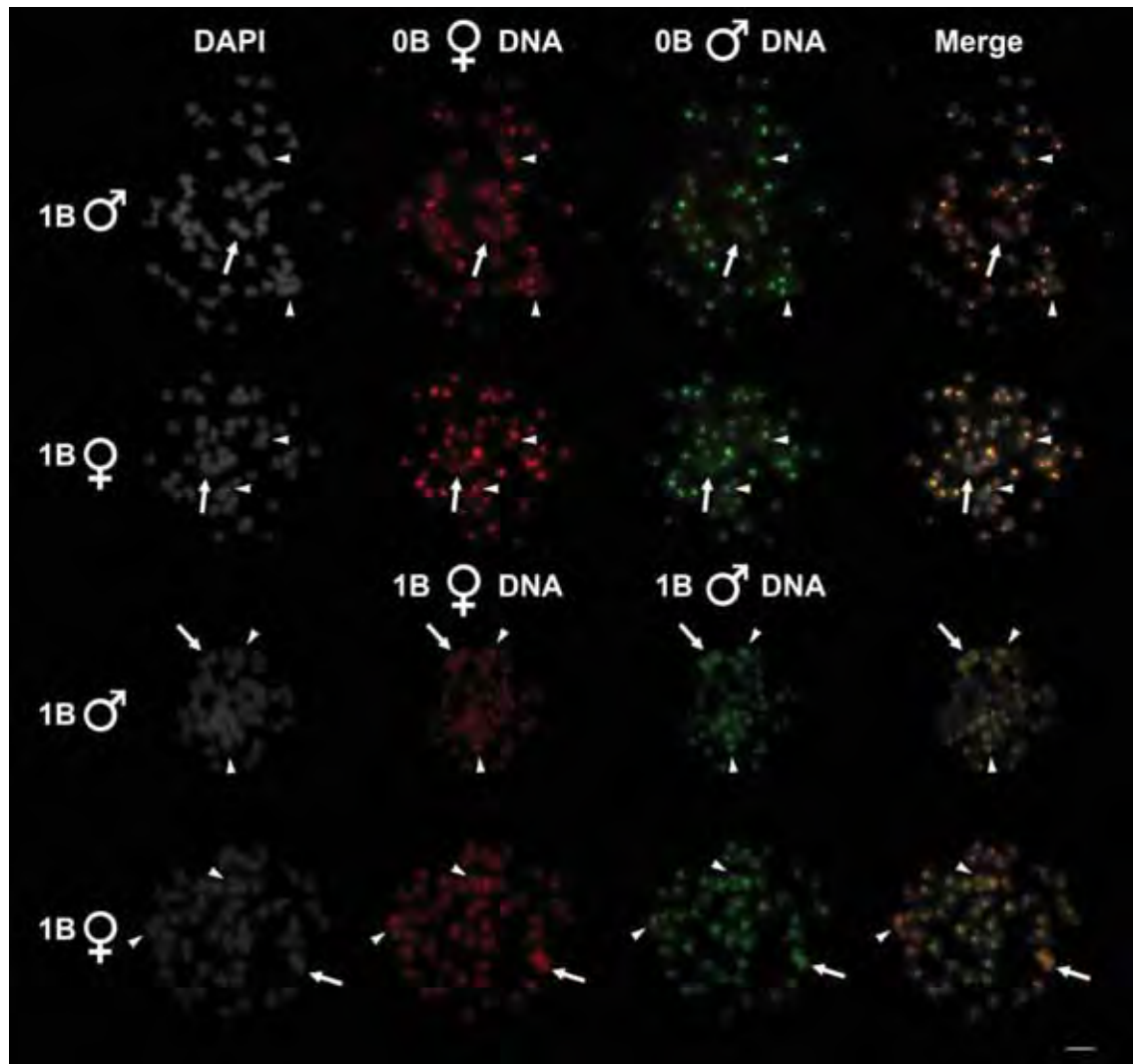


Figure 3: CGH experiments using 0B genomic probes and 1B genomic probes hybridized against 1B metaphasic spreads of male and female. Arrows indicate the B chromosomes and arrowheads indicate the 1st chromosome pair. Bar indicates 5µm.

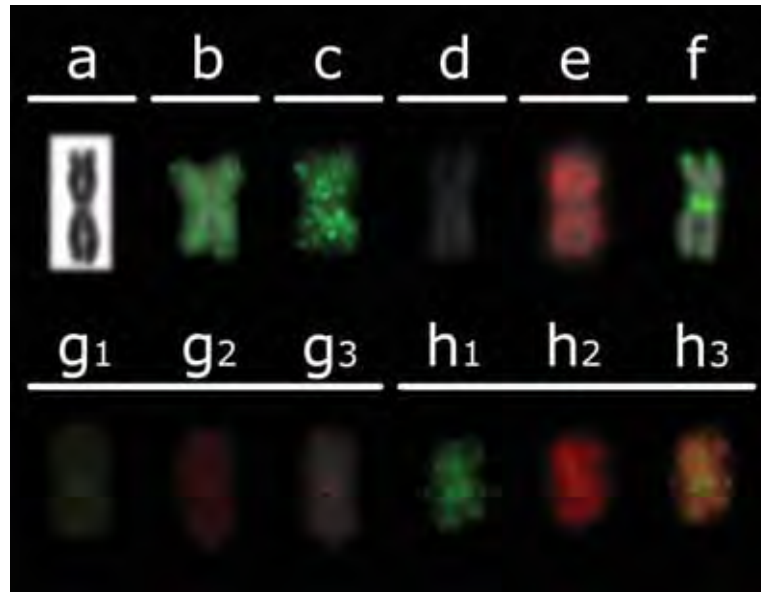
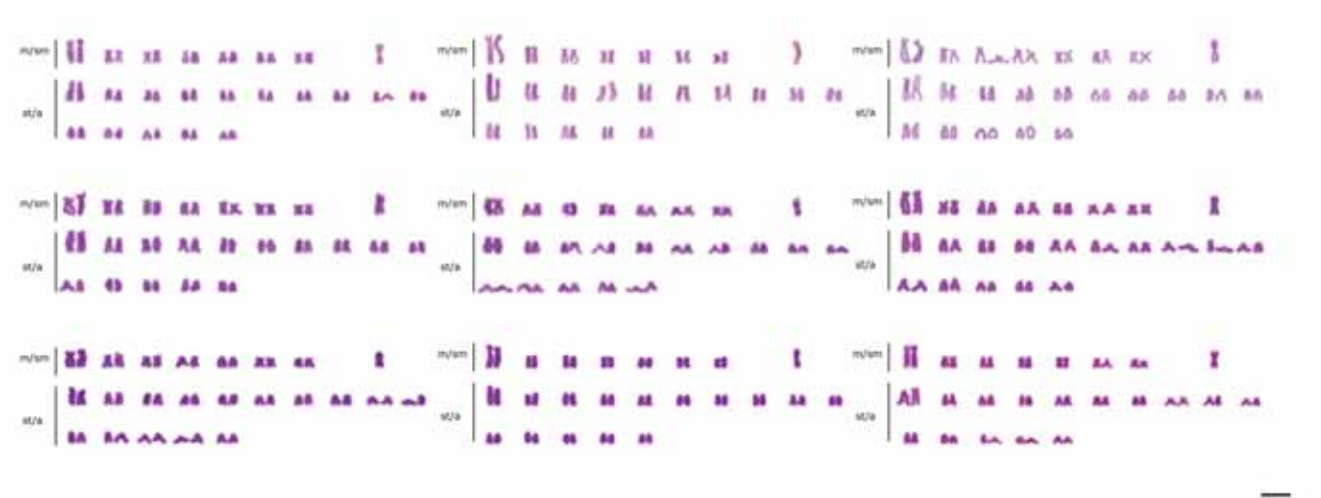


Figure 4: B chromosomes in detail. (a) Giemsa staining, (b) *Rex1*, (c) *Rex3*, (d) *Rex6*, (e) BAC #3, (f) CMA₃, (g1-g3) 0B genomic probe CGH, (h1-h3) 1B genomic probe CGH (g1 and h1) FITC (male genomic probe), (g2 and h2) rhodamine (female genomic probe), g3 is a merged figure of g1 and g2, and h3 is a merged figure of h1 and h2.

Supplementary material

Supplementary material 1: *Haplochromis obliquidens* karyotypes used on measurements. Bar indicates 5µm.



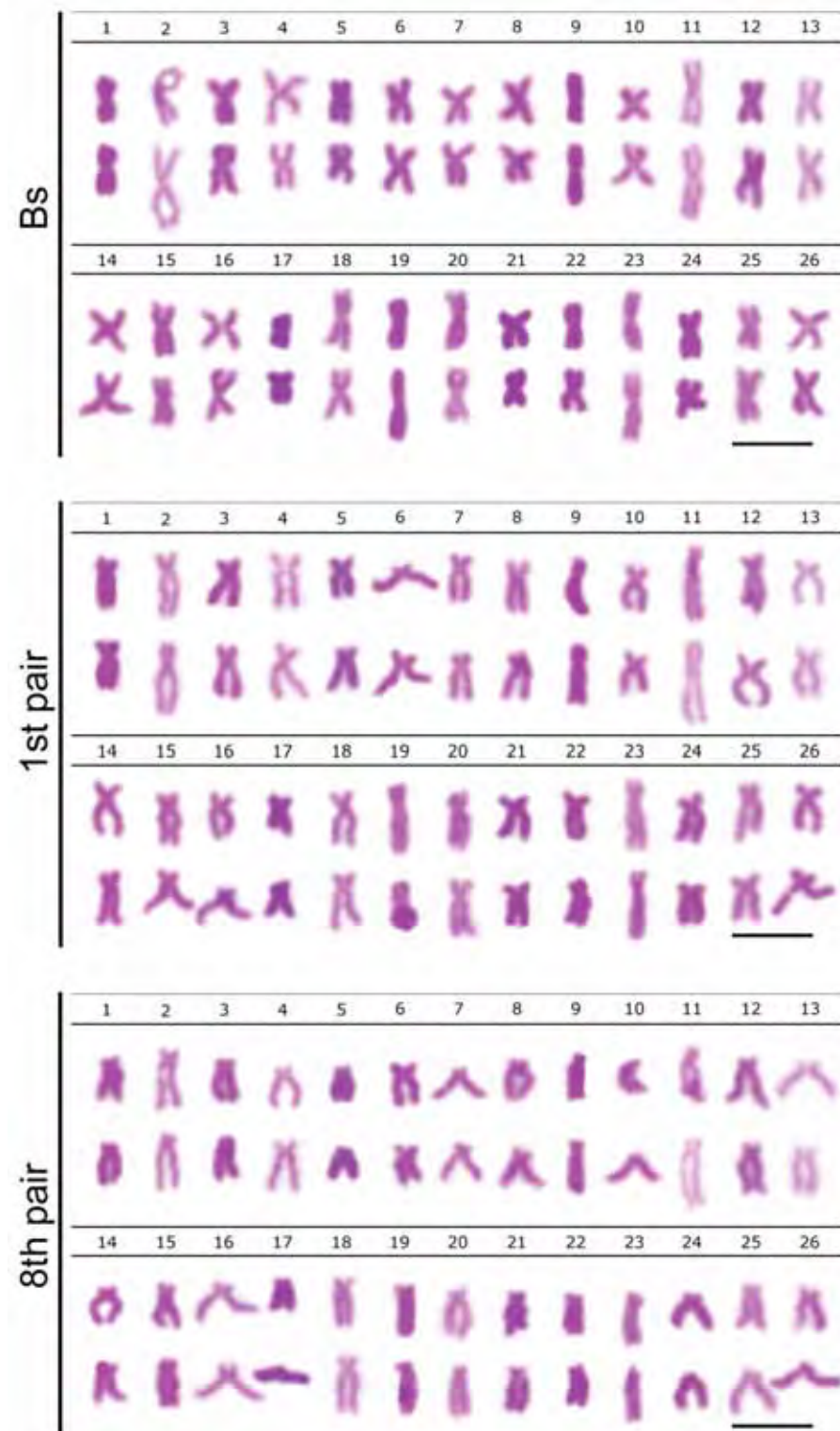
Supplementary material 2: All the measurements obtained from the nine karyotypes. Each colour represent a morphology. The first left column represent each karyotype, and each colour in this column represent a specimen. Measurements are in μm . B chromosomes measurements are not shown.

Karyotype	Pair 1	Pair 2	Pair 3	Pair 4	Pair 5	Pair 6	Pair 7	Pair 8	Pair 9	Pair 10	Pair 11											
1	1.05	0.92	1.04	0.97	1.11	0.98	0.75	0.59	0.76	0.71	0.7	0.78	0.89	0.94	0.68	0.81	0	0.39	0.57	0.66	0.48	0.46
	2.77	2.54	1.3	1.14	1.12	1.41	1.45	1.43	1.27	1.31	0.97	0.83	1.01	1.18	2.6	2.6	1.77	1.82	1.37	1.43	1.58	1.68
	0.98	27.4	1.01	44.6	1.05	49.8	0.67	34.1	0.74	37.6	0.74	42	0.91	46.7	0.74	20.7	0.19	0	0.62	29.3	0.47	23.4
	2.65	26.5	1.22	45.9	1.26	41.1	1.44	29.3	1.29	35.2	0.9	48.3	1.1	44.2	2.6	23.7	1.69	19.2	1.4	31.7	1.63	21.5
2	1.52	1.48	0.94	0.86	0.75	0.86	1	0.89	0.68	0.74	0.59	0.65	0.77	1.08	1.38	0.81	0.81	0.59	0.59	0.7	0.84	0.61
	3.55	4.06	1.94	1.95	1.93	1.92	1.24	1.54	1.55	1.5	1.55	1.67	0.92	1.14	3.4	3.24	2.3	2.36	2.25	2.09	1.7	2.87
	1.5	30	0.9	32.6	0.81	28.1	0.94	44.7	0.71	30.4	0.62	27.7	0.92	45.6	1.1	28.9	0.7	26.1	0.65	20.9	0.72	32.9
	3.81	26.7	1.94	30.5	1.92	31	1.39	36.5	1.52	32.9	1.61	27.9	1.03	48.5	3.32	20	2.33	20	2.17	25.2	2.28	17.5
3	1.23	1.21	0.91	0.73	0.73	0.8	1.14	1	0.99	0.96	0.63	0.57	0.91	1.12	0.64	0.93	0.63	0.66	0.69	0.62	0.73	0.61
	3.57	3.27	1.98	1.83	2.48	1.92	1.87	1.67	1.32	1.5	1.53	1.89	1.34	1.3	3.57	3.99	2.26	2.02	1.85	2.11	1.58	1.96
	1.22	25.6	0.82	31.5	0.76	22.8	1.07	37.9	0.98	43	0.6	29.4	1.02	40.4	0.79	15.2	0.64	21.7	0.65	27.1	0.67	31.7
	3.42	27	1.91	28.5	2.2	29.4	1.77	37.5	1.41	39.1	1.71	22.2	1.32	46.3	3.78	19	2.14	24.5	1.98	22.7	1.77	23.6
4	1.15	1.11	1.16	0.95	0.78	0.83	0.52	0.65	1.14	1.14	1.07	0.89	1.02	0.87	0.79	0.74	0	0	0.91	0.6	0.5	0.56
	2.72	2.79	1.67	1.89	1.85	1.58	1.73	1.17	1.18	1.31	1.15	0.96	1.06	0.99	3.03	2.8	2.81	2.54	1.44	1.96	2.16	1.93
	1.13	29.7	1.05	41	0.8	29.6	0.59	23.2	1.14	49.2	0.98	48.4	0.95	49.3	0.77	20.7	0	0	0.76	38.7	0.53	18.9
	2.75	28.4	1.78	33.3	1.72	34.3	1.45	35.8	1.24	46.6	1.05	48.1	1.02	46.6	2.92	21	2.57	0	1.7	23.3	2.05	22.3
5	0.92	1.12	0.51	0.6	0.65	0.98	0.98	0.87	0.79	0.75	0.79	0.67	0.9	0.98	0.74	0.72	0.58	0.73	0	0.64	0.45	0.28
	2.2	2.08	1.61	1.62	1.1	0.99	1.12	1.01	1.19	1.17	1.22	0.98	1.07	1.1	2.23	2.19	1.81	1.33	1.76	1.81	1.87	1.46
	1.02	29.3	0.56	25.4	0.91	43.6	0.93	46.7	0.77	39.6	0.73	39.2	0.94	45.7	0.73	25	0.65	26.4	0.32	0	0.37	19.5
	2.14	35	1.56	27.1	1.05	49.6	1.07	46.3	1.18	39	1.1	40.4	1.09	47	2.21	24.7	1.47	35.4	1.64	29.6	1.66	16.3
6	1.09	1.13	1.11	0.97	0.99	0.7	0.5	0.58	0.69	0.75	0.75	0.5	0.95	1.04	0.74	0.69	0.5	0.74	0.67	0.63	0.54	0.53
	3.02	2.95	1.43	1.52	1.6	1.64	1.62	1.76	1.23	1.41	1.08	1.36	1.13	1.04	2.72	2.7	1.98	1.91	1.61	1.46	1.6	1.66
	1.11	28.5	1.04	43.6	0.69	30	0.54	23.4	0.72	28.5	0.77	40.9	0.99	45.7	0.72	21.1	0.62	20.2	0.65	29.5	0.53	25.1
	2.99	27.7	1.48	38.5	1.62	29.8	1.69	24.9	1.57	34.6	1.22	37.1	1.09	50	2.74	20.4	1.95	26	1.53	30.2	1.63	24.3
7	1.06	0.88	0.93	1.04	0.72	0.84	0.79	0.66	0.65	0.56	0.87	0.86	0.79	0.81	0.73	0.77	0.3	0.67	0	0	0	0
	2.05	2.13	1.44	1.52	1.27	1.26	1.37	1.32	1.52	1.46	1.16	1.15	0.9	1.08	2.3	2.03	1.99	1.71	1.68	1.74	1.72	1.88
	0.97	34.2	0.98	39.3	0.78	36.2	0.72	36.6	0.6	29.8	0.86	42.4	0.8	46.9	0.75	24.1	0.48	12.9	0	0	0	0
	2.09	29.3	1.48	40.6	1.27	40.1	1.34	33.2	1.49	27.7	1.17	42.6	0.99	42.8	2.17	27.5	1.85	28.1	1.81	0	1.8	0
8	1.13	1	0.96	0.55	0.62	0.83	0.82	0.74	0.55	0.56	0.77	0.78	0.7	0.75	0.83	0.51	0.48	0.5	0	0	0	0
	2.78	2.47	1.32	1.42	1.3	1.24	0.96	1.03	1.15	1.07	0.97	0.91	0.89	0.87	2.55	2.36	1.38	1.59	2.11	2.08	1.84	1.74
	1.07	29	0.55	29.6	0.72	32.2	0.78	46	0.55	32.3	0.77	44.1	0.73	44.1	0.57	19.8	0.49	25.8	0	0	0	0
	2.62	28.8	1.37	27.9	1.27	40	0.99	41.7	1.11	34.2	0.94	45.9	0.88	46.3	2.46	17.8	1.48	24.1	2.09	0	1.79	0
9	1.15	1.06	0.83	0.78	0.64	0.66	0.57	0.62	0.79	0.71	0.75	0.8	0.69	0.6	0.64	0.68	0.43	0.48	0.37	0.56	0.22	0
	2.77	2.73	1.42	1.31	1.37	1.3	1.43	1.42	1.11	1.03	1.05	1.22	1.02	0.89	2.34	2.47	1.52	1.53	1.36	1.37	1.52	1.64
	1.1	29.3	0.81	36.9	0.65	31.9	0.59	28.6	0.75	41.7	0.78	41.6	0.65	40.2	0.66	21.4	0.45	21.9	0.46	21.5	0.11	12.7
	2.75	27.9	1.36	37.4	1.33	33.6	1.42	30.3	1.07	40.8	1.14	39.6	0.96	40.4	2.4	21.7	1.52	23.7	1.36	28.8	1.58	0
Total mean	Pair 1	Pair 2	Pair 3	Pair 4	Pair 5	Pair 6	Pair 7	Pair 8	Pair 9	Pair 10	Pair 11											
	1.12	0.86	0.8	0.76	0.77	0.76	0.88	0.76	0.47	0.46	0.38											
	2.6	1.57	1.52	1.4	1.32	1.2	1.05	2.73	1.89	1.74	1.8											
Morphology	29.6	35.4	34.5	35.2	36.5	38.7	45.5	21.7	19.9	20.8	17.4											

Continued...

Karyotype	Pair 12	Pair 13	Pair 14	Pair 15	Pair 16	Pair 17	Pair 18	Pair 19	Pair 20	Pair 21	Pair 22											
1	0.54	0.47	0.52	0.33	0.34	0.4	0.48	0.59	0.59	0.43	0.4	0.55	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.42	1.5	1.54	1.45	1.43	1.42	1.41	1.38	1.25	1.37	1.27	1.31	1.8	1.68	1.76	1.63	1.5	1.68	1.38	1.56	1.39	1.45
	0.5	27.4	0.43	25.3	0.37	19.3	0.53	25.4	0.51	32.1	0.48	24	0.16	15.4	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.46	23.8	1.49	18.6	1.42	22	1.39	29.8	1.31	24	1.29	29.7	1.74	0	1.7	0	1.59	0	1.47	0	1.42	0
	0.67	0.57	0.54	0.52	0.38	0.43	0.68	0.51	0.63	0.67	0.56	0.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.34	2.29	2.11	2.11	2.11	2.11	1.75	1.65	1.87	1.73	2.03	1.51	2.44	2.31	2.38	2.09	2.35	2.14	2.12	2.01	1.96	2.07
3	0.62	22.4	0.53	20.4	0.41	15.2	0.6	28	0.65	25.2	0.51	21.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.31	19.9	2.11	19.7	2.11	17	1.7	23.8	1.8	27.9	1.77	23.1	2.38	0	2.23	0	2.24	0	2.07	0	2.02	0
	0.65	0.65	0.43	0.48	0.55	0.67	0.55	0.57	0.75	0.59	0.66	0.53	0.38	0.48	0	0	0	0	0	0.35	0.46	
4	1.72	1.99	1.73	1.79	2.01	1.78	1.72	1.73	1.88	1.68	1.63	1.61	2.33	2.05	2.34	2.3	1.96	2.1	1.92	2.53	1.81	1.91
	0.65	27.4	0.45	19.8	0.61	21.0	0.56	24.2	0.67	28.4	0.6	28.8	0.43	14.2	0	0	0	0	0	0.4	19	
	1.81	25.7	1.76	21.2	1.9	27.2	1.72	24.7	1.78	25.9	1.62	24.9	2.19	19	2.32	0	2.03	0	2.22	0	1.86	19.5
5	0.38	0	0.37	0.42	0.37	0.38	0.38	0.35	0	0.38	0.25	0.6	0	0	0	0	0	0.41	0	0	0	0
	2.2	2.35	1.78	1.86	1.81	1.62	2.04	1.96	1.99	1.96	1.43	1.35	2.28	2.09	1.95	2.48	1.63	1.49	2.22	1.97	1.94	1.8
	0.19	14.6	0.39	17.2	0.38	17.1	0.36	15.6	0.19	9	0.42	14.7	0	0	0	0.21	9	0	0	0	0	
6	2.27	9	1.82	18.3	1.71	19.1	2	15	1.82	18.7	1.39	15.8	2.18	0	2.22	0	1.66	21.7	2.09	0	1.77	0
	0.34	0.48	0.43	0.36	0.37	0.42	0.46	0.48	0	0.37	0.24	0	0	0	0	0.38	0	0.37	0	0	0	
	1.4	1.4	1.45	1.35	1.49	1.47	1.41	1.41	1.71	1.26	1.36	1.3	2.07	1.85	1.77	1.33	1.6	1.22	1.85	1.61	1.79	1.78
7	0.41	19.5	0.39	22.6	0.4	20.1	0.47	24.4	0.18	9	0.12	14.8	0	0	0.19	9	0.19	9	0	0	0	0
	1.4	25.5	1.4	21	1.48	22.3	1.41	25.2	1.48	22.6	1.33	0	1.96	0	1.5	23.5	1.41	23.4	1.78	0	1.79	0
	0.37	0	0.67	0.58	0.56	0.71	0.43	0.42	0.48	0	0.4	0.49	0.4	0	0.29	0.48	0	0.28	0	0	0	0
8	1.81	1.81	1.55	1.67	1.25	1.22	1.57	1.79	1.63	1.53	1.63	1.3	2.13	1.98	1.84	1.91	1.64	1.57	1.88	1.67	1.58	1.48
	0.19	17.1	0.62	30.1	0.63	30.8	0.42	21.3	0.24	22.8	0.45	19.7	0.2	15.8	0.38	13.4	0.14	9	0	0	0	
	1.81	0	1.61	25.8	1.24	36.7	1.68	19	1.58	0	1.46	27.5	2.05	0	1.88	20.1	1.61	14.9	1.77	0	1.53	0
9	0.3	0.35	0	0.22	0.51	0.51	0.44	0.59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.36	0	0	0	0
	1.54	1.69	1.64	1.49	1.29	1.51	1.5	1.29	1.52	1.73	1.44	1.81	1.91	1.91	1.94	2.01	1.71	1.5	1.5	1.68	1.63	1.5
	0.33	16.4	0.11	0	0.51	28.2	0.51	22.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.18	0	0	0	0	0
10	1.61	17.2	1.56	12.6	1.4	25	1.39	31.2	1.62	0	1.63	0	1.91	0	1.97	0	1.6	19.5	1.59	0	1.57	0
	0.36	0.45	0.38	0	0.73	0.5	0.53	0.59	0.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.45	1.51	1.41	1.65	1.02	1.35	1.44	1.36	1.42	1.65	1.62	1.73	1.63	1.78	1.8	1.59	1.65	1.52	1.66	1.7	1.61	1.69
11	0.4	20	0.19	21	0.61	41.6	0.56	26.8	0.22	23.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.48	22.8	1.53	0	1.19	26.9	1.4	30.3	1.54	0	1.67	0	1.8	0	1.69	0	1.58	0	1.68	0	1.65	0
	0.36	0.36	0	0.56	0.32	0.33	0.62	0.74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1.63	1.59	1.63	1.21	1.24	1.49	1.32	1.32	1.62	1.55	1.48	1.4	1.6	1.7	1.72	1.52	1.74	1.63	1.47	1.34	1.22	1.21
	0.36	18.1	0.28	0	0.33	20.6	0.68	31.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.61	18.5	1.42	31.5	1.36	18.3	1.32	35.9	1.59	0	1.44	0	1.8	0	1.62	0	1.68	0	1.41	0	1.21	0
Total mean	Pair 12	Pair 13	Pair 14	Pair 15	Pair 16	Pair 17	Pair 18	Pair 19	Pair 20	Pair 21	Pair 22											
	0.41	0.38	0.47	0.52	0.3	0.28	0.09	0.06	0.08	0	0.04											
	1.75	1.63	1.53	1.56	1.61	1.51	2	1.9	1.71	1.79	1.65											
Morphology	18.8	18.7	23.5	25.1	15.5	15.9	4.23	3.24	4.42	0	2.65											

Supplementary material 3: B chromosomes and members of pairs 1 and 8 of 26 metaphases (1 to 26) used for comparative measurements. Each pair group corresponds to the same metaphase. Bar indicates 5µm.



Supplementary material 4: Measurements of each pair, and mean values and t-test.
Measurements are in μm .

Bs		1 st pair		8 th pair	
B <	B >	Homologous <	Homologous >	Homologous <	Homologous >
2.726	3.009	3.083	3.137	2.717	2.947
4.112	5.280	3.244	4.436	3.572	3.897
3.039	3.332	3.143	3.410	2.876	2.907
3.088	3.574	3.684	3.722	3.139	3.208
2.601	2.737	2.812	2.886	2.232	2.366
2.713	3.201	2.898	3.201	2.666	3.130
2.659	2.931	3.057	3.132	2.582	2.632
2.594	2.984	3.311	3.339	2.881	2.979
3.016	3.675	3.581	3.594	2.774	3.131
2.473	2.896	2.651	2.884	2.283	2.781
3.920	4.616	4.566	4.764	3.731	4.502
2.888	3.590	3.715	3.871	3.457	3.556
3.100	3.225	3.086	3.277	2.794	2.993
3.054	3.388	3.213	3.527	2.657	2.854
3.034	3.399	3.046	3.326	2.889	3.144
2.943	3.335	2.945	3.140	3.091	3.199
2.033	2.170	2.258	2.455	1.930	2.177
3.033	3.686	3.568	3.710	3.276	3.593
3.019	4.275	3.703	4.097	3.199	3.371
3.438	3.785	3.390	3.585	3.076	3.266
2.230	2.790	2.948	3.223	2.841	2.854
2.837	2.840	2.986	3.041	2.529	2.646
3.706	4.336	4.174	4.485	3.206	3.294
2.734	3.129	2.752	3.200	2.381	2.978
2.786	3.342	3.113	3.622	2.910	3.290
3.081	3.184	3.146	3.187	2.776	2.848
Total	Total	Total	Total	Total	Total
76.857	88.709	84.073	90.251	74.465	80.543
Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
2.956038462	3.411884615	3.233576923	3.471192308	2.864038462	3.097807692
Mean difference:	Mean difference:	Mean difference:	Mean difference:	Mean difference:	Mean difference:
0.455846154	0.455846154	0.237615385	0.237615385	0.233769231	0.233769231

Supplementary material 5: Tables with t-test calculations.

Bs t-test		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>

5. CONCLUSÕES

- 1- A presença do cromossomo B em *Haplochromis obliquidens* pode estar associada a alterações no formato do corpo do animal, produzindo padrões morfológicos mais homogêneos quando comparados com animais 0B.
- 2- Os dois cromossomos B presentes nesta espécie apresentam tamanhos significativamente diferentes, podendo ser consequência de diferentes quantidades de cópias dos elementos repetitivos em cada cromossomo.
- 3- O cromossomo B analisado compartilha vários tipos de sequências com o complemento A, sustentando a hipótese de uma origem intra-específica.
- 4- O cromossomo B compartilha sinais de FISH por diversas sondas de DNAs repetitivos com o par cromossômico 1, sugerindo que estas regiões podem ter participado do processo de origem do cromossomo B nesta espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Toledo L, Foresti F, Trajano E, Almeida-Toledo. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45:255-262. 1992.
- Altman, DG. Practical statistics for medical research. London. ISBN 0-412-27630-5. 1991.
- Andreata AA, Foresti de Almeida Toledo L, Oliveira C, de Almeida Toledo Filho S. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) II. ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet Cell Genet* 63:215-220. 1993.
- Basheva EA, Torgasheva AA, Sakaeva GR, Bidau C, Borodin PM. A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). *Chromosome Research* doi: 10.1007/s10577-010-9149-4. 2010.
- Berg DE, Howe MM. Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1989.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Citotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1:103-120. 1978.
- Beukeboom LW: Bewildering Bs: An impression of the 1st B- Chromosome Conference. *Heredity* 73:328-336. 1994.
- Biémont C, Vieira C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* v.443, p.521-524, 2006.

- Biet E, Sun J, Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* v27, p596-600, 1999.
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*. v16, p203-215. 2008.
- Britski HA. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*, Faculdade de Saúde Pública da USP - Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura. p79-108. 1972.
- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A, Perfectti F. Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc R Soc Lond B* 269: 2173–2177. 2002.
- Camacho JPM. B chromosomes. In: Gregory TR, ed. *The Evolution of the Genome*, San Diego: Elsevier, pp. 223-286. 2005.
- Camacho J, Sharbel T, Beukeboom I: B-chromosome evolution. *Evolution*. 163-178. 2000.
- Capy P, Bazin C, Higuët D, Langrin T. *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. Austin, TX: Springer-Verlag. 1998.
- Carrasco LAP, Penman DJ, and Bromag, N. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture* 173:207–218. 1999.
- Charlesworth B, Snegowski P, Stephan W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v.371, p.215-220, 1994.

- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G: Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95:118-128. 2005.
- Cnaani A, Lee BY, Zilberman C, et. al. Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sexual Development* 2:43-54. 2008.
- Ellegren H. Microsatelites mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* v.16, p.551-558. 2000.
- FAO. Programa de información de especies acuáticas. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es#tcNA01 26.
- Farah SB. Decifrando o genoma humano. In: *DNA Segredos e Mistérios* p.155-202. 2007.
- Feldberg E, Porto JIR, Alves-Brinn MN, Mendonça MNC, Benzaquem DC. B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenet Genome Res* 106:195-198. 2004.
- Feldberg E, Bertollo LAC. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces, Cichlidae). *Rev Brasil Genet* 1984, 7:639-645.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In *Fish adaptations* Edited by: Val AL, Kapoor BG. New Dehli and New York: Science Publishers 285-308. 2003.
- Ferreira IA, Oliveira C, Venere PC, Galetti PM. and Martins, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Genetica*, 129(3), 253-7. doi: 10.1007/s10709-006-0005-6. 2007.

- Ferreira IA, Martins C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39:411-418. 2008.
- Ferreira IA, Poletto AB, Kocher TD, Mota-Velasco JC, Penman DJ, and Martins C. Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. *Cytogenetic and genome research*, 129(4), 314-22. doi: 10.1159/000315895. 2010.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Supranumerary chromosomes systems, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sactaeofilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107-114. 1989.
- Foresti F, Oliveira C, Galetti PM Jr, De Almeida T, and Foresti L. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome* 36:1124–1128. 1993.
- Hafez R, Labat R, Quiller R. Aneuploidie observee chez les populations de gardons (*Rutilus rutilus* L.) et d'ablettes (*Alburnus alburnus* L.) de la region Midi-Pyrenees. *Bull Soc Nat Toulouse* 114 (1-2):85-92. 1978.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, v.314, p.67-74, 1985.
- Jones RN, González-Sánchez M, González-García M, Vega JM, Puertas MJ. Chromosomes with a life of their own. *Cytogenet Genome Res.* 120:265-280. 2008.
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y. Chromosomal Variability in *Akodon* sp. (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 47:317-324. 1982.

- Kasahara, S. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. 1ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. 160p. 2009.
- Katagiri T, Kidd C, Tomasino E, Davis JT, Wishon C, Stern JE, Carleton KL, Howe AE and Kocher TD. A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. BMC Genomics, 6, 1-6. doi: 10.1186/1471-2164-6-89. 2005.
- Kocher TD. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. Nature v5, p288-298. 2004.
- Li WH. Molecular Evolution. Sinauer Associates Sunderland p.177-213, 1997.
- Li YC, Kord AB, Fahima T, Berles A, Nero E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. Molecular Ecology v11, p2453-2465. 2002.
- Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. Biochemical and Biophysical Research Communication. v289, p317-324. 2001.
- Lönnig W-E, Saedler H. Chromosome Rearrangements and Transposable Elements. Annu. Rev. Genet. 36: 389-410. 2002
- Lowe-McConnell RH: Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes. In *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution* Edited by: Keenleyside MHA. New York: Chapman and Hall; 1991:60-85.
- Maina JN: The highly specialized secretory epithelium in the buccal cavity of the alkalinity adapted Lake Magadi cichlid, *Oreochromis alcalicus grahami* (Teleostei: Cichlidae): a scanning and transmission electron microscope study. J Zool Lond 251:427-438 (2000).

- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87:101-106. 1992.
- Martins C, Galetti Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363-367. 1999.
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Julio HF Jr. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia* 1995, 60:223-231.
- Mazzuchelli J, Martins C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136:461-469. 2009.
- Mcallister BF, Werren JH. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 243-253. 1997.
- Miklos GLG. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. *Mol. Evol. Genet* p.241-321. 1985.
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet Gen Res* 106:230-234. 2004.
- Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C: Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Sci* 16:51–57. 2004.
- Pauls E, Bertollo LAC. Evidence for a system of supernumerary chromosome in *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36:307-314. 1983.

- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. BMC genetics, 11, 1. doi: 10.1186/1471-2156-11-1. 2010a.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD and Martins C. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. BMC Genetics. 11:50. 2010b.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, and Belyayev A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. Cytogenetic and genome research, 120(3-4), 351-7. doi: 10.1159/000121084. 2008.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Sapre AB, Deshpande DS. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. J. Hered. 78, 191-196. 1987.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M, Parzefall J. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. Nature 373, 68-71. 1995.
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Schartl M. Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. Chromosome Research 14:231–242. 2006.
- Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58:307-324. 1976.
- Smit AFA. The origin of interspersed repeats in the human genome. Current Opinion in Genetics and Development. v6, p743-748. 1996.

- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24:625-641. 2008.
- Steeves G, Hansen D, Lamboj A. Cichlids of Africa. Vol. I: Haplochromines. Granda Publishing. 2010.
- Sumner A. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306. 1972.
- Szczerbal I, Switonski M. B chromosomes of the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. *Caryologia* 56 no.2:213-216. 2003.
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Poletto AB, Venere PC, Martins C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Res*. 125: 224-234. 2009.
- The Genome International Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. v409, p860-921. 2001.
- Therman E, Susman M. Cromosomas humanos: estrutura, comportamento y efectos. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto-SP, Brasil. 1996.
- Trapani J. Geometric morphometric analysis of body-form variability in *Cichlasoma minckleyi*, the Cuatro Ciénegas cichlid. *Environmental Biology of Fishes* 68:357-369. 2003.
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada S-I, Iwasa MA, Oda S-I, Graphodatsky. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus*

- penisulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). Chromosome Research 10:109-116. 2002.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C. 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. doi: 10.1159/000322888. 2011.
- Venere PC, Miyazawa C, Galetti PM. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. Genet Mol Biol 22:345-349. 1999.
- Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. Mol Biol Evol 16:1427–1438. 1999.
- Volff JN, Körting C, Scharl M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. Mol Biol Evol 17:1673–1684. 2000.
- Volff JN, Körting C, Froschauer A, Sweeney K, Scharl M: Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. J Mol Evol 52:351–360. 2001.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. Chromosome Research. 11:23-35. 2003.
- Zima J, Piálek J. and Macholán M. Possible heterotic effects of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. Canadian Journal of Zoology, 81(8), 1312-1317. doi: 10.1139/z03-128. 2003.

Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Nurul-Islam-Faridi M e Stelly DM. A rapid procedure for the isolation of *Cot*-1 DNA from plants. *Genome* 40:138-142. 1997.