

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Tatiana Aparecida Voltolin

***Origem, Herança e Estrutura dos Cromossomos
Supranumerários no Gênero Prochilodus (Characiformes,
Prochilodontidae)***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti

BOTUCATU, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

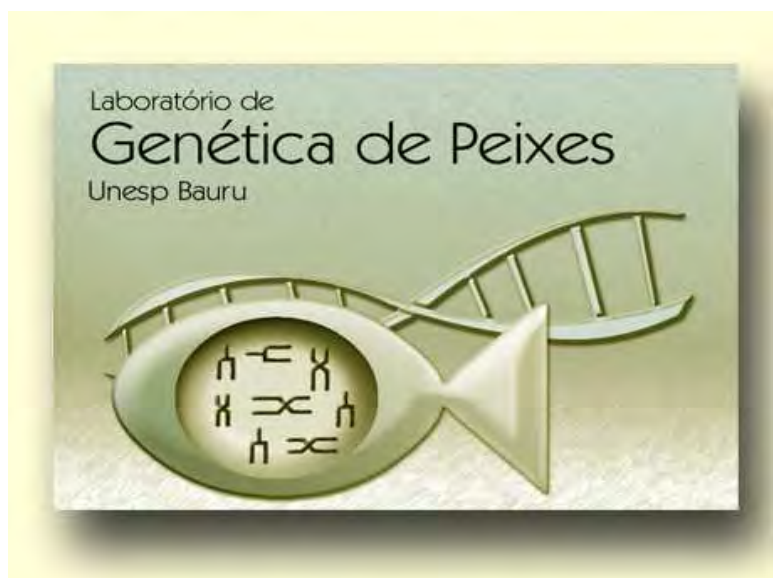
Voltolin, Tatiana Aparecida.

Origem, herança e estrutura dos cromossomos B no gênero *Prochilodus*
(Characiformes, Prochilodontidae) / Tatiana Aparecida Voltolin. – Botucatu :
[s..n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências
Orientador: Fábio Porto-Foresti
Capes: 20204000

1. Peixe – Genética. 2. Genética animal. 3. Cromossomos.

Palavras-chave: Cromossomo B; Herança; Marcadores citogenéticos; Origem;
Prochilodus.



*“...seja paciente com tudo o que não está
resolvido em seu coração. Tente amar as
próprias interrogações, como se fossem
quartos trancados ou livros escritos num
idioma estrangeiro. Não procure agora as
respostas que não podem ser dadas, pois
você não seria capaz de vivê-las. E o
importante é viver tudo. Por enquanto, apenas
viva as perguntas. Talvez então, pouco a
pouco, se mesmo perceber, você possa, em
um dia distante, conviver com as respostas”*

Rainer Maria Rilke

*A minha família – Waldemar, Ester e Elvis, sempre
presentes em todas as etapas de minha vida.*

Ao Nelson, pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, sempre me guardando em todos os momentos de minha vida.

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

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio concedido.

Ao Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior – PDEE vinculado a CAPES, pela bolsa concedida (Processo BEX:2385/10-4).

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

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – AC. Zoologia, à Seção de Pós-Graduação do Instituto e ao Departamento de Morfologia, pelo cordial apoio.

Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, CEPTA/ICMBio, pela grandiosa colaboração durante estes anos.

Ao Laboratório de Genética Evolutiva, na Universidad de Granada (Espanha) pelo proveitoso estágio.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, pela grande oportunidade oferecida durante estes nove anos de LaGenPe. Obrigada pela atenciosa orientação, pelo apoio, incentivo e confiança durante toda minha formação.

Ao Professor Juan Pedro Camacho, pela valiosa oportunidade que me ofereceu ao abrir portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar meu estágio. Nestes poucos meses que convivemos juntos foram de intenso aprendizado e pude conhecer de perto seu dinamismo como pesquisador, e principalmente como amigo. Obrigada por proporcionar-me esta oportunidade que levarei por toda a vida.

As Professoras Josefa Cabrero (Pepi) e María Dolores López-Léon (Lola), pela enorme paciência e atenção que dispensaram a mim durante meu estágio na Espanha. Obrigada por ter me proporcionado uma harmoniosa porém, breve convivência. Vocês são admiráveis como pesquisadoras e inesquecíveis como pessoas.

Ao Professor Jehud Bortolozzi, pelo alegre convívio, carinhosa atenção e, principalmente pelos valiosos ensinamentos como mestre e amigo.

Ao Professor Fausto Foresti, pelo incentivo, atenção e principalmente pelos valiosos ensinamentos os quais foram e sempre serão de grande valia no meu caminho científico.

Ao pesquisador José Senhorini pela disponibilidade, ajuda e ensinamento durante a Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado , pelo trabalho realizado junto ao CEPTA/ICMbio o qual foi de fundamental importância na concretização desta tese.

Ao Professor Wagner Franco Molina pela enorme colaboração que me dispensou enviando as preparações cromossômicas a fim de que este trabalho pudesse ser concretizado.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP-Bauru: Aline, Andréa, Bruna, Camila, Carol, Dani, Diogo, Fernanda, Larissa, Maíce, Manolo, Rosângela, Sandro e Sarah por todos os momentos que passamos juntos e principalmente pela amizade que cultivamos ao longo destes anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP-Botucatu, de modo especial ao Zeca

Aos amigos que deixei na Espanha, Bea, Mercy, Paco, Inma, Eli, Muhhamed, Muhhamed Bakkali, Ester, Letícia, María e Tati. Obrigada por me ajudarem em minhas inúmeras dificuldades diante do “novo” e pela valiosa amizade que muito me alegrava. Jamais esquecerei vocês.

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

Ao amigo Renato Devidé, pela amizade, agradável convívio e principalmente por toda a ajuda na parte experimental e nas inúmeras idas e vindas ao CEPTA/ICMBio.

A amiga Fernanda, pelo companherismo e pelos momentos que sempre me ouviu fazendo com que eu pudesse enxergar saídas nos diversos caminhos em que me deparei nestes anos.

Ao amigo Manolo pela amizade e companheirismo, principalmente na valiosa ajuda para a finalização desta tese

Aos amigos Dani e Gustavo, obrigada pelo incentivo e por toda os conselhos que vocês me dispensaram ao longo de nossa grande história de amizade.

Aos meus pais, Waldemar e Ester, vocês são para mim exemplos pelos quais estou construindo minha vida. Obrigada por todo amor e incentivo onde quer que eu estivesse e em todas as decisões que tomei. Obrigada simplesmente por tudo e por fazerem parte de minha vida.

Ao Elvis, meu irmão, pelo apoio e incentivo em tudo na minha vida

Ao Nelson, meu noivo, por todo amor e compreensão e principalmente pela doce companhia durante todos estes anos de convivência.

RESUMO

A família Prochilodontidae apresenta uma extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos, o qual pode estar relacionado ao fato de efetuarem grandes migrações com propósito reprodutivo, dispersando-se em grandes áreas. Sob o ponto de vista citogenético, apresenta uma constituição cariotípica bastante conservada com $2n=54$ cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico com número fundamental igual a 108. Além disso, a presença de microcromossomos supranumerários em algumas espécies do gênero *Prochilodus* tornou-se a base para diversos estudos citogenéticos. Diante disso, este trabalho objetivou realizar um estudo pormenorizado sobre a origem, herança e estrutura dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus*. Para isto, foram realizados estudos citogenéticos envolvendo alguns exemplares deste gênero, portadores (*Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*) e não-portadores de supranumerários (*Prochilodus argenteus*, *Prochilodus brevis* e *Prochilodus costatus*). Em todos os indivíduos analisados citogeneticamente foi constatado um número diploide de 54 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico, além da presença cromossomos B em *P. lineatus* e em *P. nigricans*. A utilização de marcadores citogenéticos convencionais (Giemsa, NOR e Banda C) e citogenéticos- moleculares (FISH) com sondas de genes ribossômicos 5S e 18S confirmaram uma constituição cariotípica conservada apenas para o número e morfologia cromossômica nestas cinco espécies. A localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foi evidenciada no braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico em *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans*. Em *P. argenteus* somente um cromossomo deste mesmo par foi marcado pela Prata, seu homólogo não exibiu marcações demonstrando inatividade desta região. Porém por meio da FISH com a utilização das sondas de DNAr 5S e 18S este último gene foi localizado em *P. argenteus* e em todos os *Prochilodus* os quais exibiram um padrão de sintenia. A distribuição da heterocromatina constitutiva (banda C) nos permitiu diferenciar exemplares de *P. lineatus* das quatro espécies restantes analisadas. Em *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus* e *P. nigricans* foram observadas marcações nas regiões centroméricas além de um grande bloco conspícuo heterocromático no braço longo do quinto par de cromossomo submetacêntrico, entretanto, em *P. lineatus* somente foram observadas marcações centroméricas. Para um melhor

entendimento sobre a herança dos supranumerários realizou-se um estudo do padrão de transmissão dos cromossomos B por meio de cruzamentos controlados utilizando-se exemplares de *P. lineatus*. Análises citogenéticas da geração filial revelaram um comportamento meiótico regular para os elementos B, ou seja, o padrão de transmissão foi de 0.48, consistente com taxa de transmissão mendeliana, confirmando um estágio de neutralização já proposta para esta espécie em análises anteriores. No estudo do conhecimento da estrutura e mapeamento dos cromossomos B em *Prochilodus* portadores (*P. lineatus* e *P. nigricans*) foram utilizadas sondas de DNA repetitivo Rex1 e das histonas H3 e H4. O padrão de distribuição de Rex1 e da histona H3 foi disperso por todo o genoma nas duas espécies analisadas, considerada, desta forma, uma característica conservada para este gênero. Entretanto, todos os cromossomos supranumerários nas mais variadas frequências foram marcados pela sonda Rex1, porém, em graus diferenciados de homologia. Entretanto, após o emprego da sonda H3 foram evidenciadas marcações na maioria dos B, mas nem todos os supranumerários foram hibridados. Mesmo diante do evidente compartilhamento destas duas sondas entre os cromossomos A e B uma análise apurada sobre sua origem partindo destes dois genes torna-se inviável devido ao alto grau de dispersão destas sequências ao longo do genoma destas espécies. A localização da histona H4 deu-se no braço curto do quarto cromossômico. Marcações referentes a esta sonda não foram evidenciadas nos supranumerários de ambas as espécies portadoras. Para o estudo da origem dos supranumerários em *Prochilodus* foram construídas duas sondas específicas de supranumerários (uma a partir do cromossomo B de *P. lineatus* (**BPL**) e outra do cromossomo B de *P. nigricans* (**BPN**)) por meio da técnica de microdissecção cromossômica associada à FISH simples e cruzada. Os resultados destas hibridações demonstraram homologia destas sondas somente com os cromossomos B em ambas as espécies. Porém esta homologia com as cromátides dos supranumerários exibiu distintos graus, demonstrando as particularidades genéticas presentes nos supranumerários. Diante disso, levantamos várias hipóteses sobre as supostas origens intra-específicas e interespecíficas para os microcromossomos B neste gênero. Por fim, foi realizado outro estudo concernente a origem dos B por meio de amplificações do DNA genômico e do DNA dos supranumerários obtidos por microdissecção cromossômica a partir de *primers* de sequências repetitivas (45S, 5S, H3 e H4) onde se observou que o gene ribossômico compartilhava

sequências entre os cromossomos A e seu respectivo cromossomo B em *P. nigricans*; algo não observado para *P. lineatus*. Diante deste resultado poderíamos associar a origem dos cromossomos B em *Prochilodus* ao gene ribossômico, porém não descartamos a hipótese de que os B poderiam ter surgido independentemente nestas duas espécies. Além disso, o compartilhamento de genes entre cromossomos A e B também pode significar uma associação de elementos saltatórios ao gene ribossômico ocorrido ao acaso.

Palavras-Chave: Cromossomo B; *Prochilodus*; Herança; Marcadores Citogenéticos; Origem

ABSTRACT

The family Prochilodontidae shows morphological and meristic characters with an extraordinary degree of stability, which may be related to the great migrations accomplished for reproductive purposes, spreading over large areas. From the cytogenetic viewpoint, it presents a much conserved karyotypic constitution with $2n = 54$ metacentric and submetacentric chromosomes with fundamental number equal to 108. Moreover, the presence of supernumerary microchromosomes in some species of the genus *Prochilodus* provided the basis for a range of cytogenetic studies. In light of the aforementioned, this study aimed to conduct a detailed investigation of the origin, inheritance, and structure of supernumerary chromosomes in *Prochilodus*. In this connection, we conducted cytogenetic studies involving a few specimens of this genus, bearers (*Prochilodus lineatus* and *Prochilodus nigricans*) and non-bearers of supernumerary (*Prochilodus argenteus*, *Prochilodus brevis*, and *Prochilodus costatus*). All subjects cytogenetically studied exhibited a diploid number of 54 metacentric and submetacentric chromosomes, besides revealing the presence B chromosomes in *P. lineatus* and *P. nigricans*. The use of conventional cytogenetic (Giemsa, NOR and C-Band) and molecular cytogenetic markers (FISH) with 5S and 18S ribosomal gene probes confirmed a conserved karyotypic constitution restricted only to the chromosome number and morphology in these five species. The location of Nucleolar Organizer Regions (NOR) was detected on the long arm of the second pair of a submetacentric chromosome in *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus*, and *P. nigricans*. In *P. Argenteus*, only one chromosome of that same pair was marked by silver staining, whereas its homologous did not show any markings, demonstrating inactivity in this region. However, through the accomplishment of FISH using 5S and 18S rDNA probes, the latter gene was located in *Prochilodus argenteus* and in all *Prochilodus* specimens, which exhibited a syntenic pattern. The constitutive heterochromatin distribution (C-banding) allowed us to differentiate among the specimens of *P. lineatus* and those of the four remaining species analyzed. In *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, and *P. nigricans*, markings in the centromeric regions and a large conspicuous heterochromatic block on the long arm of the fifth submetacentric chromosome pair were observed. However, in *P. lineatus*, only centromeric markings were detected.

For better understanding the supernumerary inheritance, a pattern study of B chromosome transmission using controlled crossings was conducted on specimens of *P. lineatus*. Cytogenetic analysis of the filial generation showed a regular meiotic behavior for the B elements, i.e., the transmission pattern was 0.48, consistent with Mendelian transmission rate, confirming a neutralization stage already proposed for this species in previous studies. Rex1 repetitive DNA probes and H3 and H4 histones were used in the study of the structure knowledge and mapping of B chromosomes in *Prochilodus* bearers (*P. lineatus* and *P. nigricans*). The distribution pattern of Rex1 and H3 histone was dispersed throughout the genome in the two species analyzed, and were therefore considered a conserved feature of this genus. Nevertheless, all supernumerary chromosomes in the most varied frequencies were marked by the Rex1 probe, but in different degrees of homology. However, after the use of H3 histones, probe markings were found in most Bs, but not all supernumerary were hybridized. Even with the evident sharing of these two probes between A and B chromosomes, an accurate analysis of their origin from these two genes is not viable due to the high degree of dispersion of these sequences throughout the genome of such species. The location of H4 histone occurred on the short arm of the fourth chromosome. Markings relating to this probe were not found on the supernumerary of both bearing species. Two specific probes were constructed for the study of the supernumerary origin in *Prochilodus* (one from the B chromosome of *P. lineatus* (**BPL**) and another from the B chromosome of *P. nigricans* (**BPN**)) through the chromosome microdissection technique combined with simple and cross-FISH. The results of these hybridizations showed homology of these probes only with the B chromosomes in both species. However, such homology with the supernumerary chromatids exhibited different degrees, demonstrating the genetic peculiarities present in the supernumerary chromosomes. Thence, we raised various hypotheses on the supposed intra- and interspecific origins of B microchromosomes in this genus. Finally, another study was conducted on the origin of Bs through the amplification of the genomic DNA and of the supernumerary DNA obtained by chromosomal microdissection using repetitive sequence-based primers (45S, 5S, H3 and H4), which revealed that the ribosomal gene shared sequences between A chromosomes and their respective B chromosome in *P. nigricans*, a feature not observed for *P. lineatus*. Given this result, we could associate the origin of B chromosomes in *Prochilodus* with the ribosomal gene, but we did not rule out the

possibility that Bs could have emerged independently in these two species. In addition, the sharing of genes between A and B chromosomes may also mean a combination of saltatory genetic elements with the ribosomal gene, which occurred by chance.

Key words: B chromosome; *Prochilodus*; Inheritance; Genetic Markers; Origin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	02
1.1 A Ictiofauna Neotropical	02
1.2 Aspectos Gerais dos Characiformes com Ênfase em <i>Prochilodus</i>	03
1.3 Características Citogenéticas da Família Prochilodontidae	06
1.4 Cromossomos Supranumerários.....	10
1.4.1 Aspectos Gerais.....	10
1.4.2 Cromossomos B em Peixes	12
1.4.3 Cromossomos Supranumerários no Gênero <i>Prochilodus</i>	14
1.5 Estrutura e Função dos Cromossomos B.....	15
1.5.1 Acumulação de Elementos Transponíveis	15
1.5.2 O Papel das Histonas na Composição dos Supranumerários	17
1.5.3 Cromossomos B como Elementos Funcionais	18
1.5.4 Herança dos Cromossomos Supranumerários.....	20
1.5.4.1 Herança dos Cromossomos Supranumerários com ênfase em <i>Prochilodus</i>	22
1.5.5 Origem dos Cromossomos Supranumerários.....	23
1.5.5.1 Origem dos Cromossomos B em Peixes com Ênfase em <i>Prochilodus</i>	25
1.6 Objetivos	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1 Materiais.....	35
2.2 Locais de Coleta dos Exemplares.....	29
3 Métodos.....	41
3.1 Estimulação de Mitoses.....	41
3.2 Preparação Direta para Obtenção de Cromossomos Mitóticos de Peixes.....	42
3.3 Marcação dos Exemplares.....	50
3.4 Utilização de Marcadores Citogenéticos e Citogenético-Moleculares	51
3.4.1 Mapeamento Cromossômico por Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	52
3.5 Microdissecção Cromossômica e Amplificação por DOP-PCR	56
3.6 Hibridação	60
3.7 Estudos de Cariótipos.....	61
3.8 Estudos de Células Meióticas.....	62
3.9 Extração de DNA.....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
Capítulo 1	70
Capítulo 2	86
Capítulo 3	103
Capítulo 4	120
Capítulo 5	140
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Ictiofauna Neotropical

Teleostei representa mais que a metade entre todos os vertebrados existentes, com aproximadamente 32.500 espécies conhecidas, desta forma, é considerado o grupo mais diversificado que habita os vários ambientes aquáticos (Nelson, 2006).

A ictiofauna neotropical é extremamente rica em peixes compreendendo cerca de 6.000 das 13.000 espécies presentes no mundo todo. A Convention on Biological Diversity reconhece 4.475 espécies de peixes neotropicais e 1.550 espécies ainda não foram descritas, totalizando 6.025 espécies distribuídas em 71 famílias de diferentes ordens (Reis et al., 2003). De acordo com Schaefer (1998) das 8.000 espécies de peixes de águas neotropicais existentes, 25% correspondem a aproximadamente todas as espécies de peixes do mundo. Vari e Malabarba (1998) concordaram com este número e mostraram que toda esta diversidade pode ocorrer somente em 0.03% de toda a água do planeta. Este dado torna-se expressivo considerando que o número de espécies neotropicais é estimado em 13.000 por todo mundo (Oliveira et al., 2009).

A ictiofauna neotropical no Brasil se apresenta como um recurso natural bastante notável, onde são conhecidas 2.481 espécies de peixes (Buckup et al., 2007). Diante disto, pode-se considerar que nosso país comporta a maior diversidade de peixes neotropicais do mundo (McAllister et al., 1997). Entretanto, são escassas as informações disponíveis sobre a ictiofauna marinha neotropical, no

Brasil, apenas 1.298 espécies de peixes marinhos tem sido descrita incluindo quatro Myxini, 139 Chondrichthyes (tubarão e raias) e 1.155 Actinopterygii (Menezes et al., 2003), mas a grande maioria destas espécies está presente nas regiões caribenhas.

A diferença entre o número de espécie descrita e o número atual nas quais foram realizados estudos incluindo genéticos e citogenéticos torna-se complicada, pois muitas destas ainda não apresentam nome científico (Reis et al., 2003).

1.2 Aspectos Gerais dos Characiformes com Ênfase em *Prochilodus*

Os Characiformes constituem um grupo dominante entre os peixes de água continental da América do Sul compreendendo formas herbívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas (Britski et al., 1972).

Dentre os Characiformes existem algumas espécies que se destacam por apresentarem características migratórias, dentre elas podemos mencionar os dourados (*Salminus* sp.) e os curimatás (*Prochilodus* sp.) (Godinho e Kynard, 2008).

A migração é um fenômeno anual em que peixes nadam em direção à cabeceira dos rios à procura de locais propícios para a desova e alimentação de suas crias. A importância deste movimento é evidente, pois a reprodução é uma fase importante na vida dos peixes (Hilsdorf e Moreira, 2008). Existem diferentes estratégias, desde as longas migrações de diversas espécies anádromas de salmão (que migram do mar para as nascentes dos rios) e chegam a nadar mais de um mil quilômetros até as áreas de desova na cabeceira. Há também os chamados peixes potamódromos, que vivem exclusivamente em rios e migram rumo às nascentes

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

Os peixes de piracema, como são conhecidos no Brasil os que realizam migrações reprodutivas, apresentam padrões de deslocamento de alta complexidade (Godinho e Pompeu, 2003). Em razão disto, o estudo de padrões migratórios de peixes brasileiros ainda é incompleto e muitas questões relativas ao tema estão para serem respondidas (Godinho, 2007).

Dentre os grandes migradores é de extrema importância mencionar os peixes da família Prochilodontidae considerados um dos componentes mais importantes da pesca comercial e de subsistência no ambiente neotropical da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Desta forma, compreende espécies com relevante participação na constituição da fauna dos rios neotropicais (Flecker, 1996). Os peixes desta família estão restritos em sua distribuição geográfica à América do Sul com exceção do Chile, onde estas espécies não foram encontradas (Mago-Leccia, 1972; Britisk, 1972; Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983; Castro e Vari, 2004).

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

Castro e Vari (2004) mostraram que a família Prochilodontidae compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (*Ichthyoelephas humeralis* e *Ichthyoelephas longirostris*), *Prochilodus* (*Prochilodus argenteus*, *Prochilodus brevis*, *Prochilodus britskii*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus hartii*, *Prochilodus lacustris*, *Prochilodus lineatus*, *Prochilodus magdalenae*, *Prochilodus mariae*, *Prochilodus nigricans*, *Prochilodus reticulatus*, *Prochilodus rubrotaeniatus* e *Prochilodus vimboides*) e *Semaprochilodus* (*Semaprochilodus brama*, *Semaprochilodus insignis*, *Semaprochilodus kneri*, *Semaprochilodus laticeps*, *Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus varii*).

Peixes do gênero *Prochilodus* são considerados os mais conspícuos, abundantes e dispersos entre os peixes neotropicais habitantes dos rios sul americanos, os quais fluem para o oceano Atlântico. O hábito detritívoro faz dos *Prochilodus* um elemento dominante na estrutura trófica da comunidade aquática (Bowen, 1983; Flecker, 1996).

Na bacia do Paraná *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) é responsável por 50 a 90% do total da ictiomassa da parte baixa do rio e nas lagoas de inundação (Bonetto, 1986; Cordiviola de Yuan, 1992; Sivasundar et al., 2000).

Prochilodus nigricans (Spix e Agassiz, 1829) é encontrado na região centro norte do Brasil, nas bacias do Amazonas e Tocantins, e também à noroeste da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Esta espécie é considerada a mais importante da várzea Amazônica (Mota e Rufino, 1997).

Prochilodus costatus (= *P. affinis* Valenciennes, 1850) é considerada uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e junto com outros *Prochilodus* de ocorrência neste mesmo local como *Prochilodus argenteus* (Agassiz, 1829) e *Prochilodus vimboides* (Kner, 1859), representam cerca de 20% de toda a biomassa

de peixes de água doce pescada no Brasil na década de 1980 (IBGE, 1988). Estatísticas indicam que a pesca extrativista de espécies do gênero *Prochilodus*, ultrapassou 30.000 toneladas, fazendo dele o recurso pesqueiro de águas interiores mais importante do Brasil no ano de 2003 (IBAMA, 2003).

Prochilodus brevis (Steindachner, 1875) é uma espécie originada das bacias nordestinas principalmente as cearenses e atualmente, encontra-se disseminada por todo o nordeste e parte do sudeste (Dourado, 1981). Segundo Fontenele (1982) esta espécie ocupa lugar de destaque pela precocidade, prolificidade, regime alimentar e principalmente, pela grande aceitação no mercado pelos habitantes da região nordeste.

1.3 Características Citogenéticas da Família Prochilodontidae

Em uma análise geral, os dados citogenéticos disponíveis sobre a ictiofauna mundial indicam que estes estudos estão concentrados, principalmente, na fauna de peixes neotropicais. Hoje, existem informações citogenéticas disponíveis para cerca de 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199 espécies não pertencentes à superordem Ostariophysi e 109 espécies de peixes marinhos (Oliveira et al., 2007). Em outra revisão, Oliveira et al. (2009) inclui a descrição de 38 espécies portadoras de cromossomos supranumerários e 62 espécies contendo cromossomos sexuais em seu conjunto cariotípico.

A família Prochilodontidae sob o ponto de vista citogenético apresenta-se como predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1990; Oliveira et al., 2003).

Análises citogenéticas conduzidas em espécies do gênero *Semaprochilodus*, ou seja, *Semaprochilodus insignis* e *Semaprochilodus taeniurus* do rio Negro, demonstraram um número diploide de 54 cromossomos (Feldberg et al., 1987). Porém, em *S. taeniurus* também foi observado a presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Feldberg et al., 1987). Posteriormente, Oliveira et al. (2003) descreveram uma constituição cariotípica de $2n=54$ cromossomos para *Semaprochilodus kneri* e *Semaprochilodus laticeps*.

Os primeiros estudos sobre a citogenética do gênero *Prochilodus* foram realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990). Anos mais tarde, diversos trabalhos na literatura mostraram que indivíduos do gênero *Prochilodus* analisados citogeneticamente apresentaram $2n=54$ cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti Jr. 2004; Artoni et al., 2006, Voltolin et al., 2009). Diante disto, pode-se afirmar que o gênero *Prochilodus* assim com a família Prochilodontidae descrita anteriormente parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada.

Uma interessante característica de algumas espécies deste gênero é a presença de microcromossomos supranumerários, primeiramente descrita em *Prochilodus lineatus* por Pauls e Bertollo (1983). Microcromossomos B também foram identificados em *Prochilodus brevis* (= *P. cearensis*) por Pauls e Bertollo (1990). Além de apresentarem todas as características dos cromossomos B de *P. lineatus*, *P. brevis* apresentou uma variação de até dois microcromossomos B. Venere et al. (1999) descreveram a ocorrência de um a dois cromossomos B em *Prochilodus nigricans*. Por fim, Oliveira et al. (2003) identificaram a presença de até

três cromossomos supranumerários em alguns indivíduos de *Prochilodus mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

Sob o ponto de vista citogenético, entre os *Prochilodus* o mais estudado é, certamente, *Prochilodus lineatus*. Análises de bandamentos realizados em preparações cromossômicas de indivíduos desta espécie evidenciaram a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas dos cromossomos A, frequentemente, os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Pauls e Bertollo, 1990; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003, Voltolin et al., 2009), embora tenha sido descrito a presença de blocos eucromáticos nos cromossomos supranumerários de exemplares de *P. lineatus* na bacia do rio Tibagi, Paraná (Artoni et al., 2006).

Alguns trabalhos descritos na literatura para o gênero *Prochilodus* demonstraram que a técnica de detecção da Região Organizadora de Nucléolo (NOR) por meio da impregnação por nitrato de Prata, evidenciou marcações no braço longo de um par de cromossomo submetacêntrico de tamanho médio (Pauls e Bertollo, 1990; Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Vicari et al., 2006, Voltolin et al., 2009, Jorge et al., 2011). A Ag-NOR simples localizada intersticialmente é uma condição bastante comum encontrada nesse grupo como em *P. brevis*, *P. argenteus*, *P. nigricans* e *P. costatus* (Pauls e Bertollo, 1990) e *P. mariae* (Oliveira et al., 2003).

A detecção de blocos heterocromáticos em espécies do gênero *Prochilodus* como em *P. nigricans* (Venere et al., 1999) e em *P. mariae* (Oliveira et al., 2003) revelou um padrão de heterocromatina em todas as regiões centroméricas dos cromossomos do complemento padrão (A). Além disso, todos os supranumerários mostraram-se heterocromáticos, conforme já descrito em *P. lineatus* por Pauls e

Bertollo, (1990); Cavallaro et al. (2000); Jesus e Moreira-Filho. (2003); Voltolin et al. (2009).

A localização *in situ* dos genes ribossomais DNAr 5S e 18S indicaram sintonia em *P. lineatus* e *P. argenteus*, assim como polimorfismo no número de genes 18S localizados nas Regiões Organizadora de Nucléolo (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti Jr. 2004).

A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação rara entre os vertebrados. Além da descrição em algumas espécies do gênero *Prochilodus*, esta sintonia também foi observada em *Salmo solar* (Pendás et al., 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Móran et al., 1996), *Astyanax* (Almeida-Toledo et al., 2002), *Triportheus nematurus* (Diniz et al., 2009), *Pimelodus britskii* (Moraes Neto et al., 2011) e em anfíbios (Lucchini et al., 1993). Por outro lado, em várias espécies de peixes, este *loci* tem sido mapeado em distintos cromossomos (Martínez et al., 1996; Morán et al., 1996; Born e Bertollo, 2000; Ferro et al., 2001; Vicente et al., 2001; Wasko et al., 2001; Noletto et al., 2007), representando a condição mais frequente descrita para vertebrados (Lucchini et al., 1993; Drouin e Muniz de Sá, 1995; Suzuki et al., 1996).

Genes ribossomais 5S ou 18S não foram localizados até o presente nos microcromossomos B de *P. lineatus* (Jesus e Moreira-Filho, 2003, Voltolin et al., 2009). A ausência de genes ribossomais nos cromossomos supranumerários corresponde à condição mais comum e encontrada nos vários organismos portadores de B.

1.4 Cromossomos Supranumerários

1.4.1 Aspectos Gerais

Os cromossomos B são amplamente distribuídos entre os eucariotos. Estes elementos extras foram descritos em mais de 1.372 espécies de plantas (10 a 15% das espécies estudadas). Em uma investigação mais recente foi constatada que dentre 23.652 espécies de angiospermas, 979 apresentavam cromossomos B (Levin et al., 2005). No reino animal, os cromossomos B foram encontrados em 263 espécies (Jones, 1982).

O grupo de animais melhor caracterizado são os Artrópodes, classe Insecta, Orthoptera representando 92 espécies, Diptera, 42 e Coleoptera, 40 espécies. Em mamíferos 55 das 4.629 espécies analisadas são portadoras de B, sendo os roedores os maiores representantes (Vujosevic e Blagojevic, 2004). Tais elementos também têm sido descritos em 10 espécies de fungos (Mills e McCluskey 1990; Miao et al., 1991 a,b; Tzeng et al., 1992; Gêiser et al., 1996; Leclair et al., 1996). A ocorrência de cromossomos B entre os peixes tem sido descrita para duas espécies da região do Paleártico (Taylor 1967; Hafez et al., 1978) e 38 espécies de peixes neotropicais (Oliveira et al., 2009).

O termo “Cromossomo B” inclui uma variedade de cromossomos extras que exibem heterogeneidade conspícua com natureza, comportamento e dinâmica evolutiva própria. Por esta razão, não é fácil buscar uma definição coerente para estes elementos genômicos (Camacho, 2005). Camacho e Parker, (1994) durante a primeira Conferência de Cromossomo B definiram que estes seriam cromossomos adicionais, dispensáveis os quais estão presentes em alguns indivíduos de

determinadas espécies e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, porém não seguindo seu caminho evolutivo. Esta definição revelou algumas das mais importantes propriedades universais destes cromossomos: são elementos dispensáveis (eles não são necessários para o ciclo de vida normal do genoma hospedeiro); sua origem é a partir dos cromossomos do complemento padrão (A) (originário da mesma espécie ou de espécie diferente); não se recombina com cromossomos do conjunto padrão (A).

Desde a sua descoberta no início do século passado por Wilson em 1907, a manutenção dos cromossomos B nos organismos portadores tem sido exaustivamente estudada (Jones e Rees, 1982; Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Puertas, 2002). Entretanto, a estrutura, função e ação destes supranumerários são particulares nos diferentes grupos, tornando-se difícil alcançar uma conclusão geral sobre sua importância para a espécie (Oliveira et al., 1997).

Um estudo detalhado permitiu a Jones (1991) caracterizar os cromossomos supranumerários ou B e diferenciá-los dos cromossomos A por apresentarem algumas características específicas: Não são cromossomos essenciais e, portanto, podem se apresentar em alguns indivíduos de uma população ou não; não possuem homólogos, ou seja, nunca emparelham entre si e nem com os cromossomos do complemento normal. Portanto, não apresentam homologia com os cromossomos do complemento padrão; são encontrados em organismos diploides e poliploides; apresentam frequência variável não só entre diferentes populações, como também inter e intra-individualmente; são morfológica e estruturalmente diferentes dos elementos do grupo (A), sendo geralmente menores que estes; são geneticamente inativos como no milho, onde nunca aparecem nos mapas de ligação; a qualidade de seu DNA não parece ser muito diferente daquela do genoma normal (A); mostram

herança não Mendeliana, como resultado de uma instabilidade mitótica e meiótica e de vários modos de deriva; em cruzamentos experimentais em muitas espécies eles são transmitidos com uma frequência mais alta que a esperada, conduzindo a um acúmulo na progênie; sua significância adaptativa nas populações é desconhecida, apesar de várias tentativas de ligá-los a variações fenotípicas e do meio ambiente. Enfim, a origem dos cromossomos B é ainda controvertida.

1.4.2 Cromossomos Supranumerários em Peixes

A maior abundância de cromossomos B entre os peixes concentra-se na ordem Characiformes, onde 38 espécies têm sido encontradas em seis famílias distintas: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Parodontidae e Prochilodontidae (Oliveira et al., 2009). Estas espécies representam 50.82% de todas as espécies com cromossomos B. Estes cromossomos mostram-se consideravelmente variável com relação ao tamanho assim como morfologia e número (Carvalho et al., 2008)

Uma das primeiras descrições de supranumerários com características pertinentes aos cromossomos B em peixes da região neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus* por Pauls e Bertollo (1983).

Com relação ao tamanho, os cromossomos supranumerários exibem uma notável variação, ou seja, existe a ocorrência de macrocromossomos como nas espécies do gênero *Astyanax* (Maistro et al., 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Ferro et al., 2003; Hashimoto et al., 2008) e em ciclídeos africanos como *Haplochromis obliquidens* (Poletto et al., 2010);

cromossomos supranumerários de tamanho médio, como em *Rhamdia* (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio et al., 2000) e em *Rhamdia quelen* (Moraes et al., 2009) ou microcromossomos, como em *Cyphocharax modestus* (Gravena et al., 2007; de Rosa et al., 2008), *Prochilodus* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009), em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al. 1989) e em *Parauchenipterus galeatus* (Lui et al., 2009)

Além da variação de tamanho constatada acima para várias espécies de peixes portadores, os cromossomos B também podem variar em número. Foresti et al. (1989) detectaram a presença de até oito pequenos cromossomos supranumerários em *M. sanctaefilomenae*. Oliveira e Foresti (1993) descreveram a ocorrência de até dois microcromossomos metacêntricos adicionais em *Steindachnerina insculpta* (Curimatidae). Moraes et al. (2009) identificaram a presença de uma variação intra-individual e interindividual de um a dois supranumerários em exemplares de *Rhamdia quelen*. E, também, recentemente, Lui et al. (2009) observaram a presença de um e dois microcromossomos B em *Parauchenipterus galeatus*.

Em espécies do gênero *Astyanax* também foram encontradas variações quanto ao número de cromossomos supranumerários. Os macrocromossomos B de *A. scabripinnis* têm sido estudados mais intensamente e desde as investigações iniciais de Salvador e Moreira-Filho (1992) e Maistro et al. (1992). A maioria dos exemplares estudados apresentou uma variação de até um macrocromossomo B metacêntrico. Em *Astyanax altiparanae* Hashimoto et al. (2008) identificaram a presença de um supranumerário. A ocorrência de dois cromossomos B apresentou-se como uma condição rara nesta espécie (Vicente et al., 1996).

Esta variação numérica dos supranumerários pode ser atribuída ao seu comportamento meiótico, ou seja, pode ocorrer disjunção irregular das cromátides, onde a não existência de um emparelhamento de uma forma geral resulta em alterações no número desses cromossomos nos diferentes gametas (Beukeboom, 1994). Somando-se a tudo isto, podem-se incluir ainda mecanismos de acumulação de cromossomos B, que algumas vezes ocorrem na meiose (Volobujev, 1981).

Apesar do aumento das informações disponíveis sobre a morfologia, herança, estrutura e outros aspectos dos cromossomos B em peixes, a exata origem e significância funcional destes elementos genômicos ainda permanece desconhecida (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Porto-Foresti et al., 1997; Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006).

1.4.3 Cromossomos Supranumerários no Gênero *Prochilodus*

Estudos realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990) sobre citogenética de peixes do gênero *Prochilodus* sugeriram a existência de uma acentuada homogeneidade dos caracteres cariotípicos básicos. Vários trabalhos na literatura mostraram que exemplares de *Prochilodus* analisados citogeneticamente apresentaram $2n=54$ cromossomos dos tipos meta e submetacêntrico, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009). Diante disto, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1990; Oliveira et al., 2003).

A ocorrência de microcromossomos supranumerários para o gênero *Prochilodus* foi primeiramente descrita em *Prochilodus lineatus* por Pauls e Bertollo (1983). Nesta espécie, os cromossomos B puderam ser facilmente identificados como microcromossomos heterocromáticos, com frequência variável de até sete elementos inter e intra-individualmente (Pauls e Bertollo, 1983; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus et al., 2003). No entanto, recentemente, Voltolin et al. (2011) descreveram a ocorrência de até nove supranumerários em exemplares de curimatã obtidos a partir de reprodução induzida. Microcromossomos B foram identificados também em *P. brevis* (= *P. cearensis*) por Pauls e Bertollo (1990). Além de apresentarem todas as características pertinentes aos cromossomos B de *P. lineatus*, exemplares de *P. brevis* apresentaram uma variação de zero a dois microcromossomos B. Venere et al. (1999) descreveram a ocorrência de cromossomos B em *P. nigricans* coletados no rio Araguaia, sendo que um entre três exemplares analisados apresentou dois microcromossomos supranumerários, os quais foram considerados totalmente heterocromáticos após o bandamento C. Oliveira et al. (2003) identificaram a presença de até três cromossomos supranumerários em alguns indivíduos de *P. mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

1.5 Estrutura e Função dos Cromossomos B

1.5.1 Acumulação de Elementos Transponíveis

Investigações preliminares sobre a composição do DNA dos cromossomos supranumerários foram baseadas em centrifugação de gradientes de densidade.

Experimentos em centeio mostraram que o padrão e a heterogeneidade de DNA repetitivo dos cromossomos B não diferiam dos cromossomos do complemento padrão A. No entanto, existia um ligeiro aumento de citosina e guanina no DNA de plantas portadoras de supranumerários (Rimpau e Flavell, 1975; Timmis et al., 1975).

Elementos retrotransponíveis são capazes de realizarem importantes funções na evolução do genoma (Kidwell e Lisch, 2000). Segundo Ferreira et al. (2011a) conhecimento sobre a origem e função destes elementos transponíveis nos genomas de peixes é ainda bastante reduzido e fragmentado, principalmente quanto à estrutura e organização nos cromossomos dos representantes deste grupo biológico. Além disso, são ainda mais escassos os trabalhos concernentes a descrição destes DNA repetitivos nos supranumerários.

Estudos moleculares mostraram que em muitas espécies os cromossomos B contêm sequências homólogas aos cromossomos A ou apresentam uma estrutura molecular diferente do conjunto padrão (Page et al., 2001; Cheng e Lin, 2003; Bugrov et al., 2007). Além disso, uma grande maioria de cromossomos B apresenta sequências repetitivas não codificantes ou elementos móveis como em *Crepis capillaris* (Jamilena et al., 1994; Jamilena et al., 1995), *Nectria haematococca* (Enkerli et al., 1997) e *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995). Em milho, as sequências analisadas revelaram-se altamente repetitivas, incluindo transposons, presente em ambos os cromossomos A e B (Alfenito e Birchler, 1993; Stark et al., 1996; Theuri et al., 2005; Lamb et al., 2007)

A presença de elementos repetitivos derivados de transposons é comum em cromossomos B de diversos organismos como nas plantas *Brachycone dichronosonidica* (Franks et al., 1996) e centeio (Langdon et al., 2000) além dos animais como no inseto *Nasonia vitripennis* (McCallister, 1995). Um retrotransposons

específico isolado em *Alburnus alburnus*, por RFLP, tem sido encontrado abundantemente nos cromossomos B desta espécie. No entanto, esta sequência esteve ausente nos cromossomos autossômicos (Ziegler et al., 2003)

A constante presença de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais e supranumerários em espécies de peixes indica que tais sequências de DNA exercem um papel importantíssimo na evolução destes genomas (Martins, 2007).

1.5.2 O Papel das Histonas na Composição dos Supranumerários

A família das histonas é considerada um excelente modelo para estudos de mapeamento cromossômico, porém esta tem sido utilizada em poucos organismos associada à Hibridação *in situ* Florescente. Somente em alguns mamíferos, anfíbios, peixes, moluscos e insetos (Graves et al., 1985; Triputi et al., 1986; Turner et al., 1988; Hankeln et al., 1993; Pendás et al., 1994; Ranz et al., 2003; Zhang et al., 2007; Cabrero et al., 2009; Cabral-de-Mello et al., 2009, 2010, 2011a, 2011b) há registros da utilização das histonas como marcadores citogenéticos (Cabrero et al., 2009).

O mapeamento destas histonas em cromossomos supranumerários ainda não nos trouxe resultados plausíveis relacionados principalmente a sua origem. Poucos trabalhos descritos na literatura evidenciaram relações de similaridade das histonas com os cromossomos A e B. Dentre eles destacam-se os realizados por Houben et al. (1997) e Houben et al. (2003) onde encontraram homologia da histona H4 entre os cromossomos A e B de *Brachycone dichromosomatica* e homologia da histona H3 compartilhada com os cromossomos A e B de *Secale cereale*, respectivamente. Teruel et al. (2010) encontraram uma associação das histonas H3 e H4 do par

cromossômico oito com os supranumerários em *Locusta migratoria* reforçando ainda mais a hipótese de origem intra-específica dos B para esta espécie. Este é um dos raros resultados que permitiram associar a exata origem dos cromossomos B a partir das histonas. Oliveira et al. (2011) entretanto, ao estudarem o padrão de distribuições da histona H3 no genoma de *Rhammatocerus brasiliensis* observaram marcações dispersas por todos os cromossomos autossômicos e seus respectivos supranumerários tornando-se difícil encontrar uma resposta quanto à exata origem dos B para esta referida espécie.

1.5.3 Cromossomos B como elementos funcionais

Os cromossomos B não contem informações genéticas consideradas vitais para a sobrevivência dos organismos portadores (Jones e Rees, 1982). Considerados cromossomos dispensáveis, os supranumerários podem ocasionar um impacto neutro ou levemente negativo (Puertas, 2002; Jones e Houben, 2003) em sua maioria são altamente heterocromático, refletindo uma natureza pobre em genes ativos (Han et al., 2007).

O efeito dos cromossomos B é usualmente cumulativo dependendo de seu número e não da presença ou ausência (Jones, 1982; Green, 1990). A baixa frequência de cromossomos B, aparentemente não demonstra nenhuma influência no fenótipo (Jones, 1982, Green, 1990). Diferentes efeitos fenotípicos têm sido descritos quanto à presença de um alto número de B. Em geral os cromossomos supranumerários influenciam negativamente a forma e fertilidade das plantas (Ostergren, 1947; Bosemark, 1957b; Gonzalez-Sanchez et al., 2004). Em *Haplopappus gracilis*, indivíduos portadores de B mostraram um aumento na

produção de pigmentos na parede do aquênio (Jackson e Newmark, 1960). Em *Plantago coronopus* a presença de cromossomos B causa esterilidade em machos (Paliwal e Hyde, 1959), no entanto, este efeito não foi observado por Raghuvanshi e Kumar (1983). Em gafanhotos *Myrmeleotettix maculatus* a presença de cromossomo B foi associada ao retardo no desenvolvimento gonadal (Harvey e Hewitt, 1979) e disfunção espermática (Hewitt et al., 1987). Em *Nasonia vitripennis* o efeito dos cromossomos B (PSR) consiste transformar machos em fêmea por destruição dos cromossomos paternos durante a embriogênese (Werren, 1991).

Todavia, não há somente efeitos negativos associados aos supranumerários. Em arroz, Cheng et al. (2000) puderam observar um discreto efeito positivo que os B proporcionavam na altura das plantas e no peso dos grãos. Em algumas espécies, indivíduos com B mostraram melhor sobrevivência sob condições de estresses. Por exemplo, em *Allium schoenoprasum* e *Allium porrum* sementes portadoras de B apresentavam uma melhor habilidade de germinação sob condições de estiagem (Gray e Thomas, 1985; Holmes e Bougourd, 1989; Plowman e Bougourd, 1994). Em *Apodemus flavicollis* foi observado uma correlação positiva entre o número significativo de cromossomos B e a massa corpórea, mas este efeito apenas era observado em machos (Zilma et al., 2003). Em híbridos, os cromossomos B podem suprimir o pareamento entre os cromossomos homólogos do conjunto padrão A. Este efeito pode ser observado nos híbridos entre *Aegilops mutica* e *Aegilops speltioides* com *Triticum aestivum* (Dover e Riley, 1972) e um tetraplóide híbrido entre *Lolium temulentum* e *Lolium perenne* (Evans e Davies, 1985; Jenkins e Jones, 2004).

Por fim, os B podem influenciar na recombinação de frequências do complemento A, aumentando em sua maioria, mas em alguns casos diminui a

frequência de quiasmas dependendo da espécie (Burt e Trivers, 2006). Em milho os supranumerários influenciam a recombinação dos cromossomos do complemento padrão por aumento da frequência quiasmática, especialmente quando o B é univalente (Carlson, 1994).

1.5.4 Herança dos Cromossomos Supranumerários

Uma das principais características dos cromossomos B é seu não-pareamento ou recombinação com os cromossomos do complemento diploide ou poliploide durante a meiose, exceto em alguns poucos casos onde se observou translocações entre cromossomos A e B como em centeio (Pohler e Schlegel, 1990) e em milho (Birchler, 1991; Carlson e Roseman, 1992; Auger e Birchler, 2002).

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

Devido a esta irregularidade quanto ao comportamento meiótico os cromossomos B apresentam uma forte tendência em se acumular. Este fato foi observado em diversos organismos portadores como, por exemplo, em *Lillium*

callosum a acumulação ocorreu principalmente quando a fêmea carregava pelo menos 1B em seu genoma, pois resultou em 80% de uma progênie portadora (Kimura e Kayano, 1961). Em muitos casos a transmissão é não-mendeliana (Jones 1982; Camacho et al., 2000; Camacho, 2005).

A variação no padrão de transmissão dos cromossomos B é um aspecto comum de herança, na qual a forma que estes são perdidos em algumas progênes e aumentada em número em outras é sempre comparada à expectativa Mendeliana (Chiavarino et al., 1998).

A expectativa do padrão de transmissão mendeliana dos cromossomos B é considerada 0.5, ou seja, de acordo com a lei de segregação proposta por Mendel a transmissão de uma determinada característica envolveria a metade das informações genéticas contidas em cada progenitor. Contudo, esta condição é tipicamente baixa devido ao fato destes serem mitoticamente e/ou meioticamente instáveis (Camacho et al., 2000). Muitos cromossomos B registraram um padrão de transmissão claramente maior que 0.5, exibindo, desta forma, o mecanismo de acumulação que é a mais importante propriedade dos cromossomos B parasíticos. A acumulação pode ocorrer antes, durante e após a meiose (Jones, 1991). Segundo Camacho et al. (2000), busca-se exaustivamente o principal mecanismo citológico causador desta acumulação.

Estudos envolvendo o processo de herança quanto à frequência dos supranumerários têm sido realizados em diversos organismos portadores, no entanto, pouco se sabe sobre herança e segregação meiótica dos cromossomos B (Camacho et al., 2000; Camacho, 2005).

O controle genético do padrão desta transmissão tem sido demonstrado em algumas espécies de animais como no gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw e

Hewitt, 1985); no bicho da farinha *Pseudococcus affinis*, (Nur e Brett, 1987, 1988); no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Herrera et al., 1996) e em algumas plantas como, *Hypochoeris maculata* (Parker et al., 1982); *Aegilops speltoides* (Cebriá et al., 1994) e em *Allium schoenoprasum* (Bougourd e Plowman, 1996).

1.5.4.1 Herança dos Cromossomos Supranumerários em Peixes com ênfase em *Prochilodus*

Estudos concernentes à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes são ainda bastante escassos na literatura (Oliveira et al., 1997). Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração da herança paternal ginogenética em *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995).

Oliveira et al. (1997) e Voltolin et al. (2010a) realizaram estudos sobre o mecanismo de herança dos cromossomos B em *Prochilodus lineatus* e verificaram que a taxa de transmissão destes cromossomos foi consistente com a expectativa do comportamento regular meiótico dos cromossomos B em ambos os sexos, demonstrando um modelo de transmissão Mendeliana (0.5). Todavia, Jones (1991) ao realizar estudo sobre a herança dos cromossomos B em *Secale cereale*, sugere um padrão não-mendeliano. No entanto, tais estudos realizados por Oliveira et al. (1997) e Voltolin et al. (2010a) sobre a herança dos cromossomos B, todos os parentais eram portadores deste tipo cromossômico.

Um taxa de transmissão mendeliana ($K_B=0.48$) foi observado por Voltolin et al. (2010a) ao estudarem o comportamento meiótico dos supranumerários de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu. Este valor classifica os cromossomos B em um estágio de neutralização conforme já proposto por Camacho et al. (1997) e Zurita et al.

(1998), onde este supranumerário para garantir sua sobrevivência no genoma hospedeiro deve sofrer mutações no intuito de reiniciar seu novo ciclo parasítico. No entanto, se processos mutacionais não ocorrerem ao longo das sequências de seu DNA ele pode desaparecer da população. Este estágio de neutralização o qual se encontra os supranumerários dos curimbatás do rio Mogi-Guaçu já tinha sido previsto anteriormente por Oliveira et al. (1997) e Cavallaro et al. (2000) e confirmado recentemente por Voltolin et al. (2010a).

1.5.5 Origem dos Cromossomos Supranumerários

Os cromossomos B foram descobertos muito cedo na história da citogenética. Somente após quatro anos do desenvolvimento da teoria da herança de Sutton-Boveri que se estabeleceu o paralelismo entre o comportamento cromossômico e a herança Mendeliana. Wilson (1906, 1907) observou a presença de cromossomos “extras” em hemípteros *Metapodius*. Casos similares foram descobertos em besouros *Diabrotica* (Stevens, 1908) e, posteriormente em milho (Kuwada, 1915). Diferentes nomes têm sido usados para descrever estes cromossomos supranumerários, incluindo “fragmentos cromossômicos extras” (Müntzing, 1944; Östergren, 1945), “supérfluos” (Hakansson, 1945), e “cromossomos acessórios” (Hakansson, 1948; Müntzing, 1948).

Não existe uma elucidação definitiva quanto à origem dos cromossomos B. Há muitas hipóteses que tentam explicar os diversos caminhos que os supranumerários podem ter sido originados (Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Berdnikov et al., 2003; Jones e Houben, 2003). É muito provável que tiveram distintas origens nos diferentes organismos portadores.

Duas hipóteses gerais têm sido propostas para elucidar tal origem. Na primeira; hipótese de origem intra-específica (Jamilena et al., 1994a, 1995b; Houben et al., 1996; Peppers et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Camacho et al., 2000), os cromossomos B surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. Por exemplo, um cromossomo B poderia se originar do próprio conjunto polissômico A, a partir de fragmentos cêntricos resultantes da fusão de cromossomos A ou da amplificação da região paracentromérica de fragmentos de cromossomos autossômicos. Uma clara evidência que favorece esta hipótese foi descrita por Keyl e Hagele (1971) quando demonstraram que os padrões de bandas nos cromossomos B de *Chironomus plumosus* eram similares ao encontrado próximo ao centrômero do quarto par cromossômico A.

Em muitas espécies sequências repetitivas isoladas de cromossomos B mostraram alta similaridade com a do conjunto padrão A, por exemplo, em *Crepis capilaris* (Jamilena et al., 1994; Jamilena et al., 1995), *Zea mays* (Alfenito e Birchler, 1993; Cheng e Lin, 2003), *Brachycone dichromasomatica* (Leach et al., 1995; Houben et al., 2001), *Secale cereale* (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993; Cuadrado e Jouve, 1994; Houben et al., 1996), *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995). Recentemente, Teruel et al. (2010) encontraram sequências das histonas H3 e H4 compartilhadas entre os cromossomos A e B, suportando a hipótese de que os cromossomos B em *Locusta migratoria* teriam surgido do cromossomo par oito. Muñoz-Pajares et al. (2011) desenvolveram marcador B-SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) para cromossomo B de *Eyprepocnemis plorans* e observaram um compartilhamento de duas sequências comuns entre os cromossomos A e B, suportando a hipótese de origem intra-específica. Estes são alguns exemplos sobre a organização molecular dos

supranumerários, no entanto, muito ainda deve ser estudado sobre a composição de seu DNA, pois estes elementos extras frequentemente são considerados heterocromáticos tornando-se susceptíveis às mutações contínuas por se tratar de um material genético altamente repetitivo.

Na segunda hipótese, da origem interespecífica (Sapre e Deshpande, 1987; Eickbush et al., 1992; McVean, 1995; Scharl et al., 1997; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001), os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização. Este modelo de origem foi primeiramente proposto por Battaglia (1964) e mais tarde confirmado por outros cientistas (McVean, 1995; Camacho et al., 2000).

A origem do cromossomo B como decorrência de processo de hibridização foi comprovada por Perfectti e Werren (2001) ao observarem a presença de cromossomos supranumerários em uma linhagem de vespas do gênero *Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre duas espécies diferentes, *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

1.5.5.1 Origem dos Cromossomos B em Peixes com Ênfase em *Prochilodus*

Pouco é conhecido sobre a composição molecular do DNA satélite presente especificamente nos cromossomos supranumerários de peixes (Jesus et al., 2003).

Os cromossomos B usualmente não se recombinaem com os cromossomos do complemento padrão A seguindo aparentemente um processo de evolução independente (López-Léon et al., 1994; Camacho et al., 2000).

No peixe ginogenético *Poecilia formosa*, a iniciação da embriogênese requer espermatozoides de machos de duas espécies já relatadas *Poecilia mexicana* ou

Poecilia latipinna. O genoma paternal é eliminado precocemente no desenvolvimento. Análises citológicas revelaram que os microcromossomos supranumerários em gerações filiais de *P. formosa* surgiram como resultado de uma incompleta eliminação do genoma paternal (Schartl et al.,1995). Este também foi considerado um caso confirmado de origem interespecífica destes elementos extras.

Antes das teorias, intra-específica e interespecífica, sobre origem dos cromossomos supranumerários serem conhecidas, Volobujev (1981) postulou duas hipóteses para explicar o surgimento destes elementos genômicos. A primeira propunha que os cromossomos B poderiam ser relíquias de rearranjos estruturais que ocorreram durante a evolução de um cariótipo ancestral. A outra teoria supunha que estes cromossomos poderiam resultar de processos de não-disjunção cromossômica dos cromossomos sexuais ou autossômicos, seguidos por um processo de inativação genética. Esta segunda suposição foi relatada pelo trabalho realizado por Salvador e Moreira-Filho (1992) ao identificarem cromossomos supranumerários entre os componentes uma população de *Astyanax scabripinnis*, proveniente do município de Campos do Jordão. A origem deste elemento genômico nesta população estudada poderia estar associada a um processo de heterocromatização comprovada pela técnica de bandamento C.

No entanto, variáveis da teoria intra-específica obtiveram um enorme embasamento nos estudos de cromossomos B em peixes. Mestriner et al. (2000); Néo et al. (2000); Jesus et al. (2003); Artoni et al. (2006); Vicari et al. (2011) sugeriram a origem dos cromossomos B por isocromossomos. Mestriner et al. (2000) e Néo et al. (2000) ao estudarem a espécie *Astyanax scabripinnis* detectaram por meio de bandamento C a presença de sequências repetitivas em ambos os braços do cromossomo B, de modo semelhantes ao par 24 do conjunto cromossômico (A)

mostrando, desta forma, argumentos favoráveis à origem dos supranumerários a partir de processo de formação de um isocromossomo. Recentemente, Vicari et al. (2011) também estudaram a origem do cromossomo B em *A. scabripinnis* a partir da utilização de sonda específica de cromossomo B, As51,18S e 5S. Estes autores propuseram uma origem intra-específica do B para esta espécie.

Contudo, hipóteses alternativas sobre a origem dos cromossomos B têm surgido em decorrência do conhecimento da estrutura molecular da identidade de fragmentos livres de DNA de origem não cromossômica, comumente encontrado nos núcleos das células. A hipótese de que estes segmentos genômicos supranumerários tenham surgido “*de novo*” a partir de processos de construção e desmanche de segmentos genômicos nucleares, em um processo fisiológico normal das células num modelo de desenvolvimento independente, não pode ser descartada (Foresti, 1998). Diante disso, pode-se concluir que os cromossomos supranumerários parecem não apresentar um modelo de origem comum, ou seja, podem ter se originado de forma independente e seguindo diferentes caminhos evolutivos.

A composição e a estrutura dos cromossomos B de *Prochilodus* vêm sendo analisadas ao longo dos anos no intuito de esclarecer, principalmente, aspectos concernentes à sua origem. Maistro et al. (2000) usando a enzima de restrição *Bam*HI, observaram a existência de diferentes classes de DNA altamente repetitivas nos genoma de *Prochilodus lineatus* e também mostraram que a composição dos cromossomos B é diferente daquela do seu conjunto autossômico. Considerando-se que os cromossomos B provavelmente surgiram dos cromossomos A (Green, 1990; Beukeboom, 1994; Camacho et al., 2000), a existência de diferentes composições de cromatina entre eles poderia mostrar que a origem dos B em *P. lineatus* não seria

um evento recente, apresentando um tempo suficiente para a acumulação de algumas modificações na sua estrutura durante seu processo evolutivo (Maistro et al., 2000).

Jesus et al. (2003) também estudaram a estrutura e origem dos microcromossomos B de exemplares de *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, utilizando a enzima de restrição *HindIII*. Após a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com o emprego das sondas SATH1 e SATH2 obtidas pela digestão enzimática, demonstraram que o DNA satélite SATH1 é compartilhado entre os cromossomos A e B desta espécie, embora nem todos os segmentos heterocromáticos dos cromossomos B sejam compostos por DNA SATH1, indicando que outras famílias de DNA repetitivo possam estar presentes nestes cromossomos. Artoni et al. (2006) ao utilizarem o DNA satélite SATH1 em exemplares de populações de *P. lineatus* da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, observaram que os sinais da sonda SATH1 apresentavam algumas diferenças nesta população em comparação a dos exemplares provenientes do rio Mogi-Guaçu. As diferenças entre estas duas populações evidenciaram que os cromossomos B podem apresentar uma evolução independente.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas na análise e identificação de sequências específicas de cromossomos nos estudos de organização e comparação genômica (Henning et al., 2008). Uma destas técnicas, a microdissecção cromossômica permitiu a análise de diferentes tamanhos de sequências de nucleotídeos uma vez que cromossomos ou segmentos cromossômicos são retirados e coletados. O desenvolvimento de sonda usando a microdissecção tem sido descrita como um procedimento adequado para comparação entre grupos de peixes e este procedimento tem revelado sucesso em estudos que envolvem a

homologia cromossômica em *Eigenmannia* (Henning et al. 2008), cromossomos sexuais em *Triportheus* (Diniz et al. 2008), peixes Cyprinid (Ráb et al. 2008) e cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* (Voltolin et al., 2010c).

Utilizando-se da técnica de microdissecção cromossômica, recentemente Voltolin et al. (2010c) isolaram um único cromossomo B de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, SP. Após o emprego da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente utilizando esta sonda específica em diferentes frequências de supranumerários, os autores observaram marcações apenas nos próprios cromossomos B em diferenciados graus de homologia. Diante disto, sugeriram uma suposta origem interespecífica do B para esta espécie. Entretanto, a origem intra-específica onde estes elementos extras acumularam inúmeras modificações ao longo dos anos apresentando um DNA totalmente diferente dos possíveis cromossomos ancestrais que o originou, não pode ser descartada.

A aplicação da técnica de microdissecção cromossômica em estudos com cromossomos B, hoje é considerada uma ferramenta de extrema importância na obtenção de informações concretas sobre a estrutura molecular e dados de sequências nos estudos sobre a origem evolutiva dos cromossomos supranumerários (Bugrov et al. 2004).

1.6 Objetivos

A presença de cromossomos supranumerários em algumas espécies do gênero *Prochilodus* torna estes animais um alvo de grande interesse no desenvolvimento de diversos estudos citogenéticos. Diante disso, os objetivos gerais deste trabalho visaram à realização de análises quanto à herança, estrutura e possível origem destes elementos genômicos. Portanto, neste trabalho propusemos:

- ✓ Caracterizar cinco espécies do gênero *Prochilodus* (*P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans*) por meio da utilização de marcadores citogenéticos convencionais (Giemsa, NOR e Banda C) e citogenéticos-moleculares com a utilização dos genes ribossomais DNAr 5S e DNAr 18S, no intuito de buscar particularidades citogenéticas que permitam diferenciar estes indivíduos;
- ✓ Efetuar cruzamentos dirigidos entre os indivíduos dos estoques reprodutores de *P. lineatus* mantidos para cultura, no intuito de analisar o padrão de transmissão dos cromossomos B nesta espécie, fornecendo informações sobre a importância e viabilidade do uso de cruzamentos controlados no entendimento do processo de manutenção dos supranumerários nestas populações selvagens;
- ✓ Promover um estudo investigativo e comparativo sobre a composição do DNA genômico das cinco espécies de *Prochilodus* utilizadas neste estudo e, principalmente do DNA dos supranumerários dos indivíduos portadores, por meio da utilização de sondas de DNA repetitivo (Rex1) e de famílias gênicas (histonas H3 e H4), no intuito de correlacionar indícios da origem e formações dos B a partir destas supostas sequências de DNA;
- ✓ Buscar informações quanto à estrutura, composição e origem dos supranumerários por meio da utilização de sondas obtidas pela técnica de microdissecção cromossômica de seus respectivos cromossomos B, associadas à Hibridação *in situ* Fluorescente simples e cruzada;
- ✓ Desenvolver um estudo sobre a origem dos cromossomos supranumerários nas duas espécies de *Prochilodus* portadoras (*P. lineatus* e *P. nigricans*) por meio de amplificações gênicas a partir de *primers* de sequências repetitivas

(Ribossômico, 5S, H3 e H4) tanto em DNA genômico como em DNA microdissecado. As análises comparativas destas sequências visam promover respostas para a possível origem destes elementos extras nos organismos portadores;

- ✓ Contribuir com informações para o entendimento do papel desempenhado pelos cromossomos B no genoma dos peixes e, de modo mais amplo, nos vertebrados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A sistemática da família Prochilodontidae é um tanto complexa devido à extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a distinção das diferentes espécies (Mago-Leccia, 1972). Esta homogeneidade e conservação dos caracteres taxonômicos pode ser explicada devido ao fato dessas espécies estarem amplamente distribuídas ao longo das grandes bacias hidrográficas da América do Sul, talvez por sua capacidade de efetuar grandes migrações com propósito reprodutivo, dispersando, dessa maneira, populações em grandes áreas. Todos os Prochilodontidae são iliófagos, possuindo assim algumas adaptações anatômicas como boca em forma de ventosa para succionar o lodo do fundo dos rios e retirar os detritos orgânicos (Mago-Leccia, 1972).

A família Prochilodontidae é composta taxonomicamente por 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies) (Castro e Vari, 2004).

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

fluem para o Oceano Atlântico. Eles são migradores detritívoros que abastecem a atividade pesqueira em muitas partes do continente (Welcome, 1979).

Dentro do gênero *Prochilodus* foram coletadas cinco espécies: *Prochilodus argenteus* (Agassiz, 1829) (figura 1a) provenientes do rio São Francisco (MG); *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) (figura 1b) coletados na represa DNOCS (Departamento de Obras Contra a Seca) (RN); *Prochilodus costatus* (= *P. affinis* Valenciennes, 1850) (figura 1c) adquiridos na piscicultura AQUICULTURA TROPICAL, município de Propiá, (SE); *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (figura 1d) coletados no rio Mogi-Guaçu, bacia do Paraná, Pirassununga, (SP) e também indivíduos desta mesma espécie resultantes de reprodução induzida realizada no CEPTA/ICMBio e *Prochilodus nigricans* (Spix e Agassiz, 1829) (figura 1e) provenientes do rio Araguaia (TO), bacia Tocantins-Araguaia.

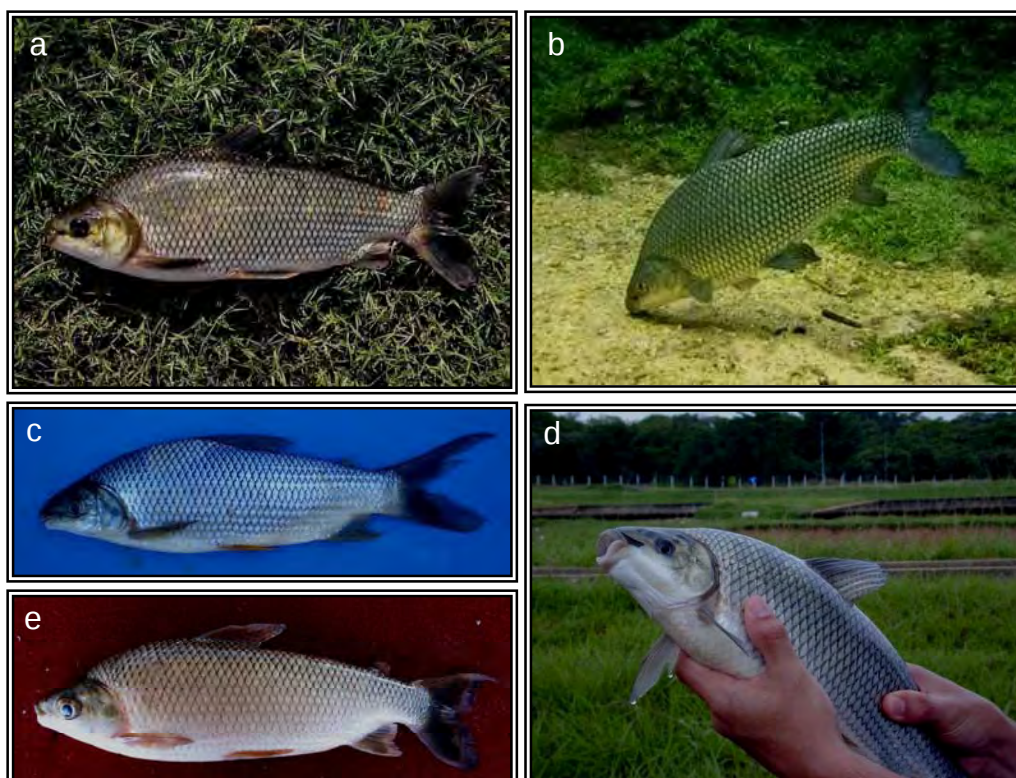


Figura 1. (a) exemplar de *P. argenteus*; (b) exemplar de *P. brevis*; (c) exemplar de *P. costatus*; (d) exemplar de *P. lineatus* e (e) exemplar de *P. nigricans*.

2.2 Locais de Coleta dos Exemplos

✓ *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus*

Na bacia do rio São Francisco são reconhecidas três espécies do gênero *Prochilodus*: *P. costatus*, *P. argenteus* e *P. vimboides*.

Prochilodus argenteus (figura 1a) classificado anteriormente como *Prochilodus marggravi* (Valbaum, 1792) se destaca por ser uma espécie de piracema mais abundante na região de Três Marias (MG), representando 50% de toda a produção de pescado.

Prochilodus costatus (= *P. affinis* Valenciennes, 1850) (figura 1c), é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e que recentemente foi introduzida na bacia do rio Jequitinhonha (Fishbase, 2005). É considerada uma espécie migratória, além de ser um importante recurso pesqueiro neste rio (Paiva, 1983).

A bacia do rio São Francisco abrange uma área total de 631.133 Km², equivalendo a 7.4% do território nacional (Paiva, 1983) (figura 2, área amarela). O rio São Francisco tem 2.780 Km de extensão, banhando sete estados e 450 municípios. Cerca de 83% de sua área reside nos estados de Minas Gerais e Bahia, onde habitam 13 milhões de habitantes, aproximadamente (Petrere, 1989; Cappio et al., 1995).

Cerca de 100 exemplares juvenis de *P. costatus* foram adquiridos da piscicultura AQUICULTURA TROPICAL, no município de Propiá, (SE). Estes animais foram mantidos em aquário no Laboratório de Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Bauru (SP) para eventual

crescimento de aproximadamente cinco centímetros no intuito de realizarmos a confecção das preparações citogenéticas.

A coleta dos 15 exemplares de *P. argenteus* foi realizada na porção do rio São Francisco próximo à represa de Três Marias, no estado de Minas Gerais (figura 2, área amarela). Os exemplares foram capturados por meio de arrasto utilizando-se redes de nylon de dois metros de altura e 30 metros de comprimento com malha de três centímetros. Assim que os peixes entravam na rede eram retirados imediatamente e acondicionados em macas impermeáveis na canoa.

Posteriormente à captura todos estes animais foram sacrificados para a confecção das preparações citogenéticas.

Exemplares testemunhos destas espécies foram fixados em formol 10%, conservados em álcool etílico 70% e encontram-se depositados no Laboratório de Genética de Peixes, da Faculdade de Ciências, UNESP em Bauru, para estudos taxonômicos futuros.

✓ ***Prochilodus brevis***

Prochilodus brevis (Steindachner, 1875) (figura 1b) é uma espécie originária das bacias nordestinas principalmente as cearenses e atualmente, encontra-se disseminada por todo o nordeste e parte do sudeste (Dourado, 1981). Segundo Fontenele (1982) esta espécie ocupa lugar de destaque pela precocidade, prolificidade, regime alimentar e principalmente, pela grande aceitação no mercado pelos habitantes da região nordeste.

A peculiar condição climática do nordeste brasileiro, sobretudo a da zona semi-árida, estabeleceu nesta vasta área de caatingas uma civilização em constante

luta pela sobrevivência, no intuito de transpor os obstáculos em busca de uma vida melhor. Quando em 1909 foi criada a Inspetoria de Obras Contra as Secas, o que se vislumbrava era uma débil economia sob a tutela do coronelismo oligarca, a extrema pobreza do sertanejo assolada pelas disparidades climáticas, um regime desigual das chuvas durante o ano e a escassez da água. Estes fatores causavam uma grande vulnerabilidade nas populações que habitavam a região. Diante disso, inicialmente houve intervenções federais no nordeste primeiramente de cunho paternalista visando benfeitoria ao povo nordestino. Mas tarde, o governo buscou bases mais científicas trazendo para a região cientistas de diversas áreas e serviços técnicos especializados (informações obtidas no site: <http://www.dnocs.gov.br>).

Os 20 exemplares de *Prochilodus brevis* foram coletados na represa DNOCS (RN). As preparações cromossômicas foram realizadas pela equipe do professor doutor Wagner Franco Molina da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Centro de Biociências Departamento de Biologia Celular e Genética) e gentilmente nos foram cedida para a realização do presente estudo.

✓ ***Prochilodus nigricans***

Foram capturados na bacia Tocantins-Araguaia (TO) (figura 2, área verde) 17 exemplares da *Prochilodus nigricans* (figura 1e).

A captura dos peixes foi realizada através de arrasto utilizando-se redes de nylon de dois metros de altura e 30 metros de comprimento com malha de três centímetros. Assim que os peixes entravam na rede eram retirados imediatamente e acondicionados em macas impermeáveis na canoa. Posteriormente à captura todos os animais foram sacrificados para a confecção das preparações citogenéticas.

Exemplares testemunhos desta espécie foram fixados em formol 10%, conservados em álcool etílico 70% e encontram-se depositados no Laboratório de Genética de Peixes, da Faculdade de Ciências, UNESP em Bauru, para estudos taxonômicos futuros.

O rio Araguaia possui uma área de drenagem de 37.700 km² e faz parte da bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia, considerado um sistema de grande importância em ambientes fluviais da América do Sul, além de possuir uma das maiores e desconhecidas área de sedimentação fluvial: a planície da ilha do Bananal (Silva, 2002).

O Araguaia não possui uma distribuição normal de vazões (Silva, 2002), isso ocorre em parte devido ao armazenamento ao longo da planície aluvial que possui um complexo sistema de lagos e a derivação de água para o braço secundário do Araguaia.

Quanto aos aspectos geomorfológicos, a bacia do rio Araguaia revela a sucessão de eventos erosivo-deposicionais e intempéricos cenozóicos que tem atuado sobre o variado substrato geológico regional. Como resultado desses processos a área mostra uma compartimentalização topográfica diversificada com planaltos, serranias, morrarias, depressões e planícies que guardam a estreita relação com as diferentes rochas que as sustentam.



Figura 2. Bacias hidrográficas brasileiras onde se realizou as coletas dos *Prochilodus* utilizados neste trabalho.

✓ *Prochilodus lineatus*

Prochilodus lineatus proveniente do rio Mogi-Guaçu realiza migração reprodutiva rio acima e migração trófica rio abaixo (Godoy, 1975). O ecossistema habitado por esta espécie na bacia do rio Paraná (figura 2, área vermelha) é formado por três rios: Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. O rio Mogi-Guaçu apresenta uma extensão de 473 quilômetros e largura média aproximada de 60 metros. Sua nascente localiza-se a uma altitude de 1.600 metros e sua foz situa-se a 470 metros

de altitude, sendo 84% de suas águas situadas no estado de São Paulo (Capeleti e Petrere, 2006).

Foram coletados 96 exemplares de *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu, especificamente, em Cachoeira das Emas, todos foram levados para o CEPTA/ICMBio, no município de Pirassununga, SP (figura 3). Após a captura, os animais foram identificados por meio da utilização de *tag* magnéticos e mantidos em tanques no CEPTA/ICMBio.

O CEPTA é um Centro Especializado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio). Criado em 1979, seu objetivo é contribuir para o uso sustentável dos recursos ícticos tropicais, através da geração, adaptação e difusão de conhecimentos científicos, tecnológicos e ambientais em benefício da sociedade. Assim, o CEPTA realiza pesquisas de biodiversidade dos recursos íctios de águas continentais - recursos genéticos; uso sustentável dos recursos pesqueiros (pesca e aquicultura); melhoria da qualidade ambiental; capacitação de recursos humanos e educação ambiental. O Centro tem como objetivo o estabelecimento de parcerias com instituições nacionais e internacionais, universidades, organizações não governamentais e com a iniciativa privada, buscando sempre a consecução de suas competências.



Figura 3. Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga, (SP).

Uma das etapas deste trabalho foi realizar uma análise detalhada sobre a herança dos cromossomos supranumerários. Para isto utilizamos como espécie-modelo a *Prochilodus lineatus* devido sua facilidade de captura em relação às outras espécies de *Prochilodus* e também às facilidades de mantê-las em cativeiro. Para isso, dispusemos das instalações do CEPTA/ICMBio, Pirassununga (SP) (figura 3), onde os reprodutores foram coletados no rio Mogi-Guaçu e mantidos em tanque durante o ano todo para que se pudesse realizar a reprodução dirigida.

3 MÉTODOS

Na análise citogenética das amostras foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Lozano et al., 1988; Oliveira et al., 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti et al., 1993) e preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al., 1981).

3.1 Estimulação de Mitoses

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

- 1)** preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0.5 g de fermento, 0.5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2)** incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 minutos;
- 3)** injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 horas;
- 4)** manter o animal em aquário bem aerado por um período de 24 a 48 horas.

3.2 Preparação Direta para Obtenção de Cromossomos Mitóticos de Peixes

✓ Técnica de Obtenção de Cromossomos Metafásicos *in vivo*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* foi a descrita por Foresti et al. (1981). O procedimento consiste em:

- 1)** injetar na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0.025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- 2)** deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 minutos;
- 3)** sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCl (0.075M);
- 4)** dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5)** transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 minutos;

- 6)** retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 7)** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9)** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10)** pingar o material em lâminas;
- 11)** deixar secar ao ar.

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

✓ ***Técnica de Obtenção de Cromossomos Metafásicos in vitro***

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro* foi a descrita por Foresti et al. (1993). O procedimento consiste em:

- 1)** sacrificar o animal, retirando tecidos da parte anterior do rim, brânquias e testículos no caso dos machos;
- 2)** colocar os tecidos retirados em placas de Petri contendo 6 ml de solução de Hanks em temperatura ambiente;
- 3)** dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, dissociar inicialmente o material com pinças de ponta fina e depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta *Pasteur*;

- 4) retirar a suspensão celular da placa de Petri e transferí-la para um tubo de centrífuga. Acrescentar 1 gota de solução de colchicina a 0.05% e agitar levemente;
- 5) transferir o tubo para o interior de uma estufa a 37°C por 15 minutos;
- 6) centrifugar o material a 1.000 rpm por 8 min. Retirar e descartar o sobrenadante, acrescentar 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e agitar levemente;
- 7) retornar o tubo para o interior da estufa a 37°C por 30 min;
- 8) retirar o tubo contendo suspensão de células da estufa, adicionar 5 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente) e agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur. Deixar repousar por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 9) adicionar cerca de 6ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos;
- 10) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador novo. Centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100 rpm;
- 11) repetir o item 8 por duas ou três vezes e fazer a suspensão final;
- 12) pingar o material em lâminas;
- 13) deixar secar e proceder à coloração.

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

✓ ***Técnica de Obtenção de Cromossomos Metafásicos por Meio de Cultura de Linfócitos***

Uma das principais etapas do presente trabalho foi a realização de um estudo aprofundado sobre a herança dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus*

lineatus. Diante disso, foram capturados 96 exemplares desta espécie na população natural do rio Mogi-Guaçu, especificamente em Cachoeira das Emas, Pirassununga, SP. Após a captura, os animais foram identificados e mantidos em tanques no CEPTA/ICMBio (figura 3), após serem marcados com *tags* magnéticos (figura 4a, b, c).

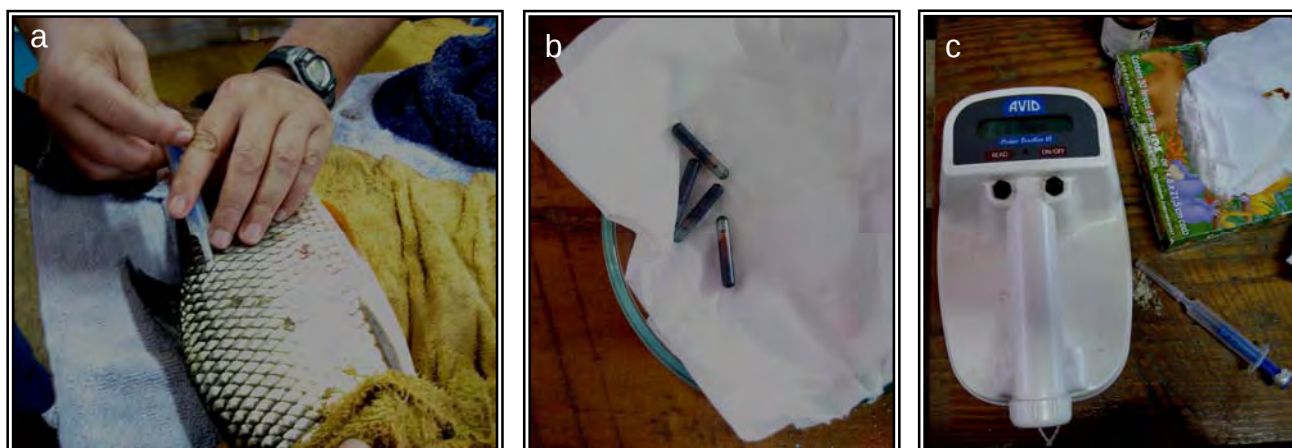


Figura 4. (a) Introdução de um pequeno *tag* na região dorsal do animal, próximo à nadadeira dorsal, com o auxílio de uma seringa injetora que, ao ser pressionado o êmbolo, desloca o *tag* (b) para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal. Após a introdução do *tag*, sempre que necessário o animal pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor (c).

Com a finalidade de otimizar os cruzamentos dirigidos, considerou-se imprescindível o conhecimento prévio do número de cromossomos supranumerários entre estes parentais. Para isto, utilizou-se de uma técnica não invasiva, a cultura de linfócitos, na elaboração das preparações cromossômicas. Desta forma, evitou-se o sacrifício dos animais, além de possibilitar a elaboração dos cruzamentos dirigidos e a reutilização destes peixes em estudos posteriores.

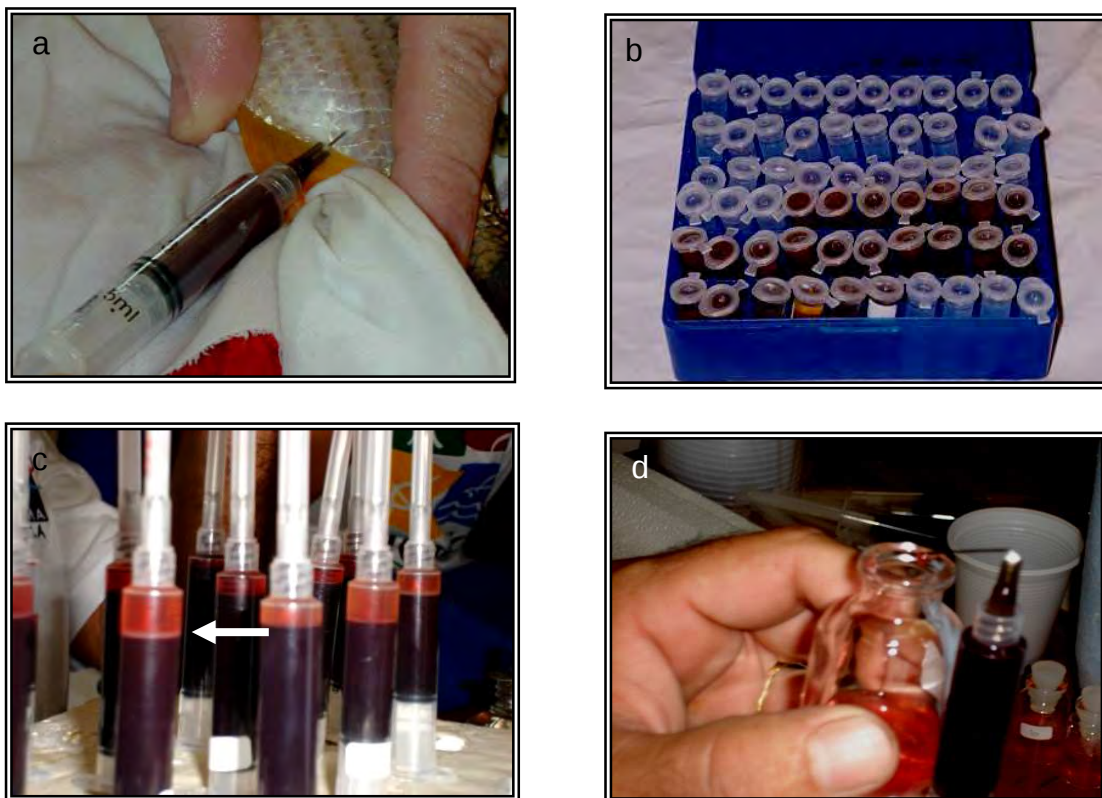


Figura 5. Coleta de sangue para análises moleculares **(a)** e para a confecção de preparações cromossômicas **(b)**. O sangue foi deixado na seringa tempo suficiente para que ocorresse a separação das hemácias e leucócitos (seta branca) **(c)**. Lançamento dos leucócitos em meio de cultura **(d)**.

A técnica por cultura de linfócitos utilizada foi a descrita por Fenocchio e Bertollo (1988) e consiste em:

- 1)** anestesiá-lo com solução de benzocaína (100 mg/l);
- 2)** limpar a região caudal com álcool iodado e puncionar a veia caudal, retirando de 3 a 5 ml de sangue;
- 3)** aguardar até separação do soro, linfócitos e hemácias e retirar os linfócitos para serem colocados na cultura. Descartar o soro e as hemácias;
- 4)** colocar os linfócitos em 5.2 ml de meio de cultura, que consiste em: 4 ml de meio 199 (sais de Earle) + 1 ml de soro bovino + 0.1 ml de antibiótico + 0.1 ml de PHA;
- 5)** incubar a cultura a cerca de 28°C por 3 dias;

- 6)** 15 minutos antes de colher a cultura, colocar 0.1 ml de solução aquosa de colchicina a 0.025%;
- 7)** para colher o material, centrifugar por 7 minutos a 700 ± 100 rpm e descartar o sobrenadante;
- 8)** acrescentar 7 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M) e agitar levemente;
- 9)** deixar o tubo no interior de uma estufa a 28°C por 30 minutos;
- 10)** retirar da estufa, colocar 6 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 11)** adicionar 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 minutos;
- 12)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a 900 ± 100 rpm;
- 13)** repetir o item 12 por duas ou três vezes;
- 14)** pingar o material em lâminas;
- 15)** deixar secar ao ar.

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

Após a análise citogenética dos exemplares capturados e identificados, foram registradas as frequências dos cromossomos B e estes passaram a constituir a geração parental. Com base nos valores de frequência determinados, foram selecionados 16 indivíduos, 10 machos e 6 fêmeas, formando 14 casais de reprodutores (figura 6). Após a elaboração desta matriz de cruzamentos realizou-se a reprodução artificial induzida nas dependências do CEPTA/ICMBio Pirassununga, SP (figura 7).

CASAL 1 Macho 1B X Fêmea 2B F ₁ - Viveiro 16	CASAL 2 Macho 2B X Fêmea 2B F ₁ - Viveiro 17
CASAL 3 Macho 3B X Fêmea 2B F ₁ - Viveiro 19	CASAL 4 Macho 2B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 02
CASAL 5 Macho 1B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 04	CASAL 6 Macho 5B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 05
CASAL 7 Macho 3B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 01	CASAL 8 Macho 4B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 09
CASAL 9 Macho 6B X Fêmea 3B F ₁ - Viveiro 03	CASAL 10 Macho 6B X Fêmea 4B F ₁ - Viveiro 08
CASAL 11 Macho 2B X Fêmea 4B F ₁ - Viveiro 07	CASAL 12 Macho 5B X Fêmea 5B F ₁ - Viveiro 11
CASAL 13 Macho 6B X Fêmea 5B F ₁ - Viveiro 12	CASAL 14 Macho 5B X Fêmea 4B F ₁ - Viveiro 06

Figura 6. Matriz de cruzamentos envolvendo exemplares de *P. lineatus* (machos e fêmeas) identificados citogeneticamente sobre suas respectivas frequências de cromossomos supranumerários.

Os resultados destes cruzamentos deram origem à geração filial, sendo os indivíduos estocados separadamente em tanques para crescimento e eventual sacrifício. Os animais provenientes da geração filial foram sacrificados ao atingirem um tamanho mínimo de cinco centímetros, para a confecção de preparações cromossômicas no intuito de analisar a herança de cromossomos supranumerários nos indivíduos resultantes de cada cruzamento.



Figura 7. Etapas da reprodução artificial induzida realizada no CEPTA/ICMbio, Pirassununga, SP. Primeiramente realizou-se a extrusão dos ovócitos da fêmea da espécie *P. lineatus* **(a)**; estes ovócitos obtidos **(b)** foram divididos em pequenos recipientes **(c)** em seguida realizou-se o processo de espermição do macho desta mesma espécie **(d)** nos pequenos recipientes contendo os ovócitos das respectivas fêmeas **(e)**, para que ocorresse a ativação dos gametas no processo de fecundação acrescentou-se água nos recipientes seguida por uma leve movimentação destas células **(f)**, os recipientes contendo os ovos fecundados **(g)** foram transferidos para incubadoras **(h)** para a eventual eclosão **(i)**. Transcorridos aproximadamente oito dias, os alevinos foram transferidos para tanques de criação **(j)** no intuito de acelerar o crescimento.

3.3 Marcação dos Exemplares

Tendo em vista a realização de um trabalho de caracterização genética dos indivíduos utilizados como reprodutores, exemplares de *Prochilodus lineatus* foram marcados com *tags* e mantidos vivos em tanques da piscicultura do CEPTA/ICMBio. Os *tags* são pequenos bastonetes de metal magnetizados que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras, empregado para identificação de diversos produtos.

O procedimento de marcação dos exemplares segue o descrito por Porto-Foresti (2001), que consiste em:

- 1)** primeiramente deve-se anestésiar o animal em uma solução de 2 g de anestésico (benzocaína) em 20 L de água;
- 2)** introduzir o *tag* na região lombar esquerda, perto da nadadeira dorsal do animal, com o auxílio de uma seringa injetora (figura 10a);
- 3)** pressionar o êmbolo, que desloca o *tag* para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal;
- 4)** após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor. A identificação é feita passando-se o leitor sobre a região onde foi introduzido o *tag* e a leitura é feita diretamente no mostrador;

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

3.4 Utilização de Marcadores Citogenéticos e Citogenético-Moleculares

✓ *Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) Através da Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NO_3)*

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

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0.5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NOR é o seguinte:

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

✓ **Caracterização da Heterocromatina Constitutiva**

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

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0.2N em temperatura ambiente e posteriormente lavar com água destilada;
- 2) passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
- 3) banhar em HCl 1N a 60°C e então lavar novamente com água destilada;
- 4) incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH=6.8) a 60°C e lavar com água destilada;
- 5) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7.5% em tampão fosfato (pH=6.7).

3.4.1 Mapeamento Cromossômico por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

✓ **Obtenção de Sondas de DNAr 5S e 18S**

As sondas de DNAr 5S e 18S foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico de *P. lineatus* utilizando os primers A (5_-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3_) e B (5_-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC- (Pendás et al., 1994) e NS1 (5_-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3_) e NS8 (5_-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3_) (White et al., 1990). A sonda de DNAr 5S foi marcada por meio da incorporação biotina dUTP (Roche Diagnostics) e a DNAr 18S por meio da incorporação

digoxigenina dUTP, ambas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de acordo com as instruções do fabricante.

A obtenção da sonda de DNAr (18S/ITS4) utilizada no estudo da origem dos cromossomos B em *P. nigricans* foi primeiramente obtida a partir de amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do DNA genômico desta mesma espécie utilizando os *primers* 18S (5'GCTTTTGTACACACCGCCCGTCGC 3') e ITS4 (5'ATATGCTTAAATTCAGCGGG 3') em uma reação contendo: 18.2 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2.0 µl de dNTP (2µM), 0.5 µl de cada primer (10mM), 0.3 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de amplificação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 34 ciclos a 94°C (30s), 55°C (30s) e 72°C (30s) com extensão final de 72°C por 7 minutos. Esta sonda foi marcada pela técnica de Nick Translation com biotina-dATP seguindo os procedimentos abaixo:

- 1)** em um tubo de 0.5 ml preparar uma solução contendo 5 µl de uma solução de 10X dNTP (contendo 0.1 mM de biotina-dATP), 5 µl de uma solução tamponada de enzimas (0.0075 unidades/µl de DNase I e 0.5 unidades/µl de DNA polimerase I), 1 µg de DNA e água para um volume final de 45 µl. Misturar a solução em um vórtex e centrifugar brevemente a 14.000 rpm;
- 2)** incubar a 16°C por 1hora. O aumento ou a diminuição no tempo de incubação leva a produção de segmentos de DNA mais curtos ou mais longos, respectivamente;
- 3)** adicionar 5 µl de um tampão de bloqueio (*stop buffer*). Remover os nucleotídeos não incorporados através da precipitação do DNA em etanol conforme descrito abaixo;

- 4) adicionar 5 µl de uma solução a 3M de acetato de sódio e 120 µl de etanol absoluto gelado (-20°C). Misturar os componentes invertendo várias vezes o tubo contendo a mistura e incubar a -70°C por 30 min ou -20°C por 2 horas;
- 5) centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Remover e descartar o sobrenadante;
- 6) ressuspender o DNA em 500 µl de etanol a 75% gelado (-20°C). Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Remover o sobrenadante e secar o DNA a temperatura ambiente;
- 7) adicionar 20 µl de uma solução de hibridação (50% formamida deionizada, 10% de sulfato de dextrano, 2XSSC e 20 mg/ml de albumina fetal bovina). Estocar o DNA a -20°C.

✓ **Obtenção da Sonda de DNA Repetitivo (retrotransposons) Rex1**

A sonda de retrotransposon Rex1 foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico de *P. lineatus* utilizando os primers 1 - RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGGCCTTCAACACC-3') e RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3'). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 11.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0.5 µl de cada primer (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.5 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 34 ciclos a 95°C (30s), 56°C (30s) e 72°C (20s) com extensão final de 72°C por 5 minutos.

✓ **Obtenção das Sondas das Famílias Histônicas H3 e H4**

As sondas histônicas H3 e H4 foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico de *P. lineatus* com os seguintes *primers* H3aF (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC) e H3aR (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC) (Colgan et al.,1998). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 17.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Biotina-11-dUTP, 0.5 µl de cada *primer* (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 30 ciclos a 94°C (15s), 48°C (15s) e 72°C (15s) com extensão final de 72°C por 7 minutos.

Genes da histona H4 foram amplificados com *primers* universais H4F2s (5'-TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C) e H4F2er (5'-CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT) (Pineau et al., 2005). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 17.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Biotina-11-dUTP, 0.5 µl de cada *primer* (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 30 ciclos a 94°C (20s), 58°C (20s) e 72°C (30s) com extensão final de 72°C por 7 minutos.

3.5 Microdissecção Cromossômica e Amplificação por DOP-PCR

As preparações cromossômicas de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu e de *P. nigricans* oriundos do rio Araguaia (TO) obtidas segundo a técnica já descrita e após a fixação com Carnoy foram ressuspensas em metanol puro e posteriormente, estocadas a 4° para a realização da microdissecção cromossômica.

✓ Preparação das Agulhas

Foram utilizados capilares de borosilicato com aproximadamente 10-70 µm de diâmetro. Os capilares foram colocados em “pulley” (Narishige PC-10) e aquecidos, formando a ponta da agulha a ser utilizada. Após a preparação estas foram armazenadas em um local protegido para evitar a contaminação.

✓ Técnica de Microdissecção Cromossômica

A microdissecção cromossômica foi realizada de acordo com o método descrito por Ludecke et al. (1989) e Zhou e Hu (2007). As suspensões celulares mantidas em metanol em refrigeração foram centrifugadas e ressuspensas em fixador Carnoy gelado. Para a realização da microdissecção as células foram pingadas diretamente em lamínulas (24mm x 50mm) e, subsequentemente, coradas com Giemsa (5%) por 8 minutos. Cromossomos B foram identificados por meio de microscópio invertido (IM-35, Carl Zeiss, Germany) e dissecados em um micromanipulador (5171-Eppendorf, USA) (figura 8) utilizando agulhas siliconizadas com diâmetro de 10-70 µm. Aproximadamente 5 a 10 cromossomos

supranumerários foram retirados de diferentes metáfases de um único indivíduo portador e transferidos por meio da quebra da ponta da agulha para um tubo de Eppendorff contendo os seguintes reagentes: 10nM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 7.5 - 8.0; 0.1% SDS; 0.1% Triton X100; 500 µM proteinase K e 30% glycerol.

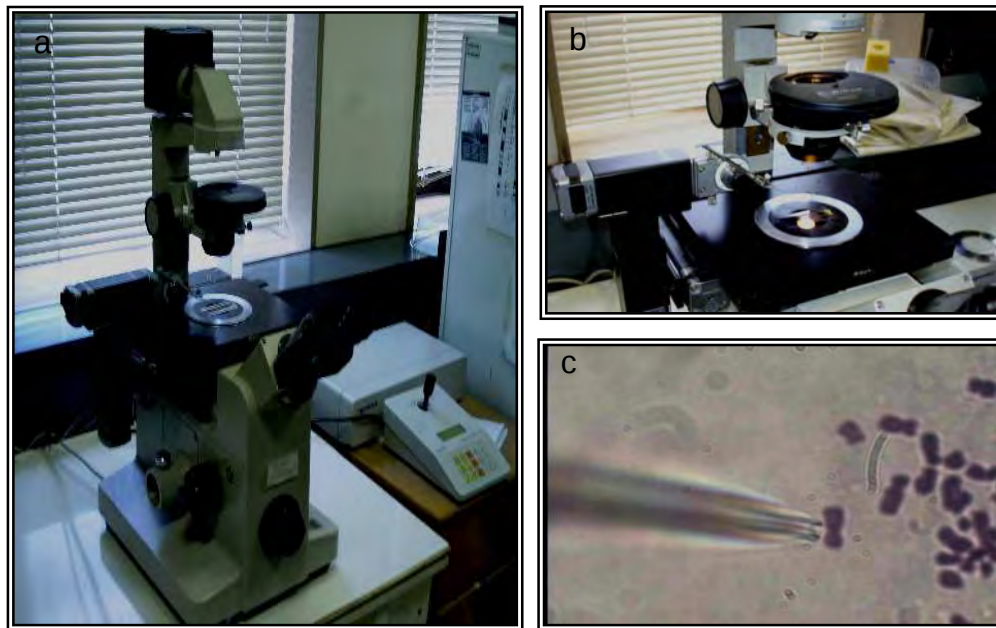


Figura 8. Obtenção da sonda específica de cromossomos supranumerários de *Prochilodus nigricans* por microdissecção cromossômica. Microdissector Cromossômico **(a)** evidenciando a agulha de microdissecção cromossômica **(b)** e o processo de microdissecção cromossômica **(c)**.

✓ **DOP-PCR**

Esta PCR consiste numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados com o uso de um *primer* degenerado (DOP- *Degenerate Oligonucleotide Primer*) proposto por Telenius et al. (1992). A DOP-PCR compreende duas etapas de amplificação, uma de baixa estringência (primeira PCR) e outra de alta estringência (segunda PCR) e PCR de marcação.

Primeira PCR

Na primeira amplificação, condições de baixas temperaturas permitem o anelamento do *primer* degenerado e a extensão de vários sítios no genoma.

Num tubo de 0.5ml foi preparada uma mistura contendo os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	6.0µL
Tampão Termosequenase (10x)	1.0µL
dNTP (2mM cada)	1.0µL
<i>Primer</i> DOP (10µM)	1.0µL

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0.5mL, contendo 9.0µL mix de DOP-PCR, este foi aquecido a 95°C por 10 min e centrifugado brevemente. Em seguida, acrescentou-se 1.0µL da enzima Termosequenase 4U/µl (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB). As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc.) de acordo com as seguintes condições:

	94°C ---- 3min
12 ciclos	{ 94°C ---- 1min e 30seg
	{ 37°C ---- 2min
	{ 37°C ---- 1min, com acréscimo de 0,2°C/seg até 72°C
	{ 72°C ---- 2min
30 ciclos	{ 94°C ---- 1min e 30seg
	{ 62°C ---- 1min
	{ 72°C ---- 30 seg
	{ Manutenção a 4°C

Segunda PCR

A segunda amplificação foi preparada para um volume final de 50µL num tubo de 0.5mL, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	30.0µL
Tampão da enzima (10x)	5.0µL
MgCl ₂ (50mM)	1.5µL
dNTP (2mM cada)	5.0µL
Primer DOP (10µM)	5.0µL
Taq (5U/µl)	0.5µL
Produto da 1ª PC	3.0µl

Posteriormente, a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições:

30 ciclos	{	90°C ---- 3min
		94°C ---- 1min e 30seg
		56°C ---- 1min e 30seg
		72°C ---- 1min e 30seg
		4°C ----- manutenção

PCR de marcação

No PCR de marcação, foram utilizados os reagentes descritos abaixo para um volume final de 50µL. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.

Água milli-Q autoclavada	30.7µL
Tampão da enzima (10x)	5.0µL
MgCl ₂ (50mM)	1.5µL
dATP (2mM)	1.0µL
dCTP (2mM)	1.0µL

dGTP (2mM)	1.0µL
dTTP (2mM)	0.6µL
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0.7µL
Primer DOP (10µM)	5.0µL
Taq (5U/µl)	0.5µL
Produto da 2ª PC	3.0µL

3.6 Hibridação

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) que consistiu em:

- 1)** incubar as lâminas em uma solução contendo 200 µl de 2XSSC (pH=7.0) e 2 µl de RNase (100 mg/ml) em uma câmara úmida a 37°C por 1 hora;
- 2)** em um *coplin* de vidro preparar 40 ml de uma solução de desnaturação (70% Formamida, 2XSSC) e aquecer a 72°C em um banho-maria. Colocar as lâminas na solução de desnaturação e incubar por 5 min;
- 3)** desidratar as lâminas em banhos sucessivos em etanol a 70%, 80% e 100% a - 20°C por 3 min cada. Deixar as lâminas secando ao ar;
- 4)** diluir as sondas em solução de hibridação na proporção de 3 µl de sonda para 12 µl de solução de hibridação.
- 5)** desnaturar as sondas incubando-as em um banho-maria a 72°C por 10 min;
- 6)** colocar 15 µl da sonda diluídas em cada lâmina e cobrir com lamínula. Selar as bordas da lamínula com cimento de borracha;
- 7)** incubar as lâminas a 37°C por cerca de 15 h (*over night*) em uma câmara úmida;
- 8)** remover o cimento de borracha e as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de 50% formamida/2XSSC por 10 min cada. Nesse passo a

estringência da reação pode ser aumentada ou diminuída na mesma proporção em que a concentração de formamida é aumentada ou diminuída;

9) lavar as lâminas duas vezes em 2XSSC por 10 min a 42°C. Lavar as lâminas duas vezes em 4XSSC por 10 min a 42°C;

10) remover as lâminas da solução de 4XSSC. Aplicar em cada gota de suspensão celular 60 µl do reagente de detecção (anti-digoxigenina marcada com rodamina e avidina marcada com FITC) e cobrir com uma lamínula de plástico. Incubar as lâminas a 37°C por 15 a 60 min em uma câmara úmida.

11) remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de PBD por 5 min a temperatura ambiente;

12) lavar as lâminas em uma solução de PBS por 5 min a temperatura ambiente;

13) contracorar com 15 µl de uma solução DAPI

14) selar as bordas da lamínula com esmalte e analisar em um microscópio de fluorescência.

As metáfases foram analisadas sob o fotomicroscópio de fluorescência (BX61, Olympus) equipado com câmera digital refrigerada (Olympus DP70) e fotomicrografadas utilizando o software Pro MC 6.0.

3.7 Estudos de Cariótipos

A partir dos dados obtidos através das análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases de cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diplóide modal para os exemplares de cada espécie.

Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos, foram fotografadas em fotomicroscópio

Olympus, modelo BX61, com objetiva de imersão de 100X utilizando o software Pro MC 6.0.

✓ **Montagem dos Cariótipos**

Os cromossomos foram inicialmente arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia pelo software Adobe Photoshop Cs5 onde foram classificados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm). Posteriormente, foram emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho, para a organização final do cariótipo, conforme descrito por Levan et al. (1964).

3.8 Estudo de Células Meióticas

A técnica para obtenção de meiose consistiu em macerar em uma lâmina escavada, alguns pedaços das gônadas juntamente com uma ou duas gotas de ácido acético 45% ou 60%; com uma pipeta Pasteur foi colocada (não pingar) uma gota sobre a lâmina e em seguida aspirada. Este processo foi repetido em várias regiões da lâmina. Posteriormente, estas foram secas em uma placa de metal a temperatura de 35^oa 40^o e coradas com Giemsa 5%. Todas as preparações de meiose foram analisadas e fotografadas no fotomicroscópio Olympus, modelo BX 61.

3.9 Extração de DNA

As amostras de tecido (fígado, nadadeira e sangue) de *Prochilodus* utilizadas neste presente trabalho foram empregadas em estudos moleculares principalmente,

nas análises envolvendo a origem e distribuição dos cromossomos B neste grupo de peixe.

Foram utilizados protocolos de extração de DNA com kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification kit - Promega.” O DNA genômico total extraído foi quantificado em gel de agarose 1% por meio de comparações a partir do ladder “Low DNA Mass Ladder – Invitrogen.”.

✓ ***Extração de DNA a Partir de Amostras de Fígado***

- 1)** enumerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1.5 ml);
- 2)** retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3)** adicionar 900 µl de “Cell Lysis Solution” ao tubo e homogeneizar a amostra;
- 4)** incubar a solução homogeneizada por 10 minutos em temperatura ambiente. Inverter o tubo 2 ou 3 vezes durante este período;
- 5)** centrifugar a amostra por 30 segundos a 13000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 7)** homogeneizar as amostras no vórtex o tempo suficiente para ressuspender o material;
- 8)** adicionar 400 µl de “Nuclei Lysis Solution” ao tubo e utilizar a ponteira para homogeneizar a amostra, pipetando de 5-6 vezes;
- 9)** incubar a solução por 30 minutos a 37° C no banho-maria;
- 10)** adicionar 1.5 µl de RNase e inverter o tubo 25 vezes;
- 11)** incubar por mais 30 minutos à 37° C. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;

- 12)** adicionar 100 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar rapidamente no vórtex e centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 13)** remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 400 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 14)** inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis;
- 15)** centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 16)** adicionar 400 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;
- 17)** centrifugar 2 minutos a 13000 rpm;
- 18)** deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 19)** adicionar 75 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4°C.

✓ ***Extração de DNA a Partir de Amostras de Nadadeira***

- 1)** numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1.5 ml);
- 2)** retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3)** adicionar 600 µl de “Nuclei Lysis Solution”;
- 4)** adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;
- 5)** levar ao banho-maria a 60° C por aproximadamente 2 horas; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6)** adicionar 2.5 µl de “RNase” e colocar no banho-maria a 37° C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;

- 7)** adicionar 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar rapidamente no vórtex;
- 8)** levar ao gelo por 5 minutos;
- 9)** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10)** remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11)** inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis;
- 12)** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13)** adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;
- 14)** centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm;
- 15)** descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 16)** adicionar aproximadamente 30 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65°C ou 24 horas a 4°C.

✓ ***Extração de DNA a Partir de Amostras de Sangue***

- 1)** numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1.5 ml);
- 2)** retirar uma pequena quantidade de sangue, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3)** adicionar 300 µl de “Cell Lysis Solution”;
- 4)** adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;

- 5)** levar ao banho-maria a 55° C por aproximadamente 1 hora; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6)** centrifugar por 30 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 7)** vortexar o pellet e adicionar 300 µl de “Nuclei lysis solution” e vortexar por 20 segundos;
- 8)** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 9)** transferir o sobrenadante para a segunda série de tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de Isopropanol e misturar por inversão;
- 10)** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 11)** adicionar 300 µl de Etanol 70% a temperatura ambiente;
- 12)** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 13)** descartar o etanol cuidadosamente virando o tubo;
- 14)** deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 15)** adicionar 100 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de capítulos, referentes aos tópicos abordados. As citações bibliográficas referentes a cada capítulo encontram-se discriminadas no item Referências Bibliográficas, visando otimizar a apresentação da tese.

CAPÍTULO 1 Variabilidades cariotípicas em *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) reveladas por marcadores citogenéticos

CAPÍTULO 2 Neutralização dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* detectada pelo comportamento mitótico e meiótico

CAPÍTULO 3 Primeira evidência do elemento retrotransponível Rex1 e das histonas H3 e H4 em *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*, espécies portadoras de supranumerários

CAPÍTULO 4 Origem dos cromossomos B em *Prochilodus* obtida por pintura cromossômica associada à FISH simples e cruzada

CAPÍTULO 5 Ancestralidade dos cromossomos B de *Prochilodus* associado ao gene ribossômico 45S

CAPÍTULO 1

Variabilidades cariotípicas em *Prochilodus*
(Characiformes, Prochilodontidae) reveladas por
marcadores citogenéticos

RESUMO

A família Prochilodontidae é considerada um grupo com características cromossômicas bastante conservadas seja pelo número, morfologia e padrões de bandamentos. Entretanto, a molécula de DNA está em constante mutação ao longo dos anos seja por pressões seletivas ambientais e/ou genéticas que podem resultar em alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas. Diante disto, este trabalho objetivou realizar um estudo citogenético com a utilização de marcadores convencionais (Giemsa, NOR e banda C) e moleculares (FISH) com sondas de DNA ribossômico 5S e 18S em cinco espécies pertencentes ao gênero *Prochilodus* (*Prochilodus argenteus*, *Prochilodus brevis*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*) coletadas em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Os resultados demonstraram conservadorismo concernente ao número, morfologia cromossômica e localização dos DNAr 5S e 18S. Entretanto, a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) diferenciou exemplares de *P. argenteus* das outras espécies analisadas. Na análise do padrão de heterocromatina constitutiva foi possível constatar diferenças entre *P. lineatus* e os exemplares de *Prochilodus* restantes. Estes resultados demonstraram que a família Prochilodontidae já não pode ser considerada extremamente conservada sob o ponto de vista citogenético. Estas pequenas alterações cromossômicas observadas por análise de bandamento cromossômico podem resultar em modificações citogenéticas que diferenciarão estas espécies ao longo de sua história genético-evolutiva.

INTRODUÇÃO

A família Prochilodontidae compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies) (Castro e Vari 2004). Dentre os grandes migradores é de extrema importância mencionar os peixes do gênero *Prochilodus*, considerados um dos componentes mais importantes da pesca comercial e de subsistência no ambiente neotropical da América do Sul (Castro e Vari, 2004), com exceção do Chile, onde estas espécies não foram encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983). Desta forma, compreende peixes com relevante participação na constituição da fauna dos rios neotropicais (Flecker, 1996).

Dados citogenéticos sobre representantes do gênero *Prochilodus* têm mostrado uma estrutura cariotípica conservada de $2n=54$ cromossomos com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990). Diante disso, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1990). Entretanto, poucas espécies e/ou populações apresentam variações cariotípicas relacionada à presença de cromossomos supranumerários como em *Prochilodus brevis*, *Prochilodus lineatus*, *Prochilodus mariae* e *Prochilodus nigricans* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Dias et al., 1998; Venere et al., 1999; Maistro et al., 2000; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009).

A utilização de marcadores citogenéticos convencionais como a impregnação por nitrato de Prata na identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) evidenciou em algumas espécies do gênero *Prochilodus* NOR simples em somente

um par cromossômico (Pauls e Bertollo, 1990; Venere et al., 1999, Oliveira et al., 2003; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Vicari et al., 2006; Voltolin et al., 2009).

O conhecimento sobre a identificação e localização cariotípica dos genes ribossomais 18S e 5S por meio da técnica de FISH (Hibridação *in situ* Fluorescente) no genoma de espécies da família Prochilodontidae é ainda bastante restrito (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti Jr., 2004). Porém, estudos utilizando sondas com estes genes ribossomais indicaram sintenia para os sítios 18S e 5S em *P. lineatus* e em *P. argenteus* assim como polimorfismos no número de genes 18S (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti Jr., 2004, Voltolin et al., 2009).

Vários estudos de bandamento C têm sido realizados em representantes da família Prochilodontidae. Um padrão de heterocromatina constitutiva frequentemente observado está presente na região centromérica de todos os cromossomos do complemento padrão (A) na forma de blocos bem caracterizados (Pauls e Bertollo, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Jesus e Moreira-Filho 2003; Artoni et al., 2006, Voltolin et al., 2009).

Apesar das características citogenéticas dos *Prochilodus* serem consideradas conservadas por muitos autores, o objetivo deste presente estudo foi realizar uma análise comparativa com utilização de marcadores citogenéticos convencionais e citogenéticos moleculares em alguns exemplares do gênero *Prochilodus* coletados em diferentes bacias hidrográficas brasileiras no intuito de encontrar possíveis diferenças cromossômicas que possam ter ocorrido nestas populações ao longo dos anos possibilitando a diferenciação destas espécies sob o ponto de vista citogenético e sua conservação sob o aspecto ecológico.

MATERIAIS e MÉTODOS

Para a realização deste estudo comparativo sobre as características citogenéticas dos indivíduos do gênero *Prochilodus* foram analisados 20 exemplares de *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP; 17 indivíduos de *Prochilodus nigricans* oriundos da bacia Tocantins-Araguaia (TO); 15 exemplares de *Prochilodus costatus* adquiridos na piscicultura AQUICULTURA TROPICAL, município de Propriá, SE; seis exemplares de *Prochilodus argenteus* coletados na bacia do rio São Francisco e cinco indivíduos de *Prochilodus brevis* obtidos na represa DNOCs (Departamento de obras contra a seca), em Natal (RN).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelos métodos de estimulação de mitoses (Lozano et al., 1988; Oliveira et al., 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti et al., 1993), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al., 1981) e por cultura de linfócito segundo Fenocchio e Bertollo (1988). A montagem dos cariótipos das espécies foi realizada de acordo com Levan et al. (1964).

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foram identificadas no complemento cromossômico utilizando a técnica de coloração por nitrato de Prata desenvolvida por Howell e Black (1980) e os padrões de heterocromatina constitutiva nas preparações cromossômicas foram obtidos segundo o método proposto por Sumner (1972).

A Hibridação *in situ* Fluorescente foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) utilizando sondas de DNAr 5S e 18S obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico dos *Prochilodus* estudados utilizando os *primers* A (5_-TACGCCCCGATCTCG TCCGATC-3_) e B (5_-

CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC- (Pendás et al., 1994) e NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (White et al., 1990). A sonda de DNAr 5S foi marcada por meio da incorporação biotina dUTP (Roche Diagnostics) e a DNAr 18S por meio da incorporação digoxigenina dUTP, ambas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de acordo com as instruções do fabricante.

As sondas 5S e 18S foram desnaturadas em formamida 70% (2XSSC), por 5 min. O DNA foi hibridado a 37°C *overnight* em câmara úmida (1mg de sonda desnaturada, formamida 50%, 10mg/ml de sulfato de dextrano e 5mg/ml de DNA de esperma de salmão). As sondas hibridadas foram detectadas por reações avidina-FITC e anti-digoxigenina associada à rodamina respectivamente. As lâminas foram contracorada com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) e fotografadas com fotomicroscópio de fluorescência (BX 61, Olympus) equipado com câmera digital refrigerada Olympus DP70, utilizando o software Pro MC 6.0.

RESULTADOS

Todos os exemplares do gênero *Prochilodus* (*P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans*) coletados nas diversas bacias hidrográficas brasileiras apresentaram uma constituição cariotípica de $2n=54$ cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico com número fundamental igual a 108 (figura 1a, b, c, d, e). Além disso, nesta análise citogenética foi evidenciada a presença de cromossomos supranumerários em todos exemplares de *P. lineatus* analisados (figura 2a) e em *P. nigricans* onde somente um exemplar era portador de um único cromossomo B o qual apresentou uma variação intra-individual, ou seja, a cada 30

metáfases analisadas 23 apresentaram 1B, as sete restantes não possuíam supranumerários (figura 2b).

A utilização da técnica de detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) pela impregnação por nitrato de Prata revelou marcações simples no braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico de *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans* (figura 1b, c, d, e, em destaque). Em *P. argenteus* registrou-se a marcação correspondente à NOR em apenas um cromossomo do segundo par submetacêntrico. No entanto, em seu homólogo não foi possível identificar a localização da região correspondente a NOR por emprego desta técnica citogenética convencional com nitrato de Prata (figura 1a em destaque Ag-NOR). Este padrão de Ag-NOR foi encontrado em aproximadamente 40 metáfases em todos os exemplares de *P. argenteus* analisados.

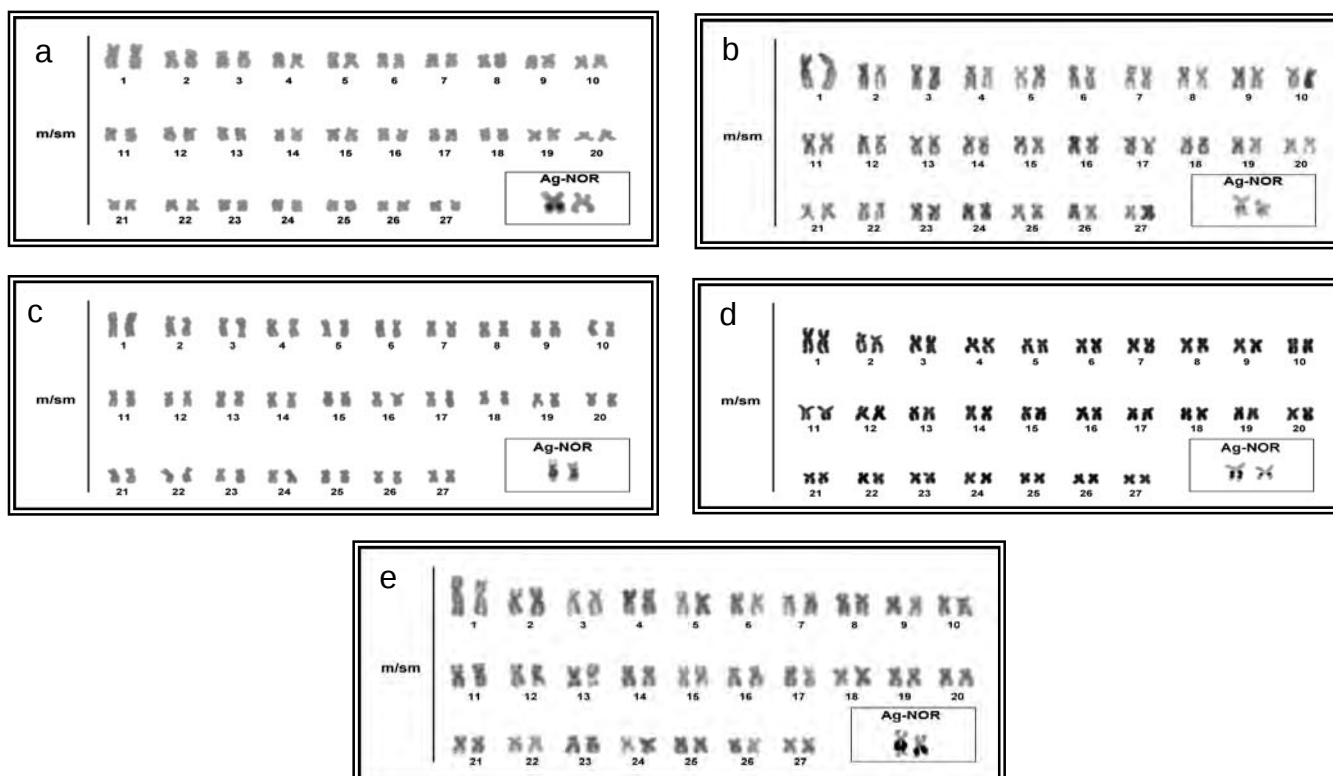


Figura 1. Cariótipos das cinco espécies de *Prochilodus* analisadas nestes trabalho em (a) *P. argenteus*; em (b) *P. brevis*; em (c) *P. costatus*; em (d) *P. lineatus* e em (e) *P. nigricans*. Em destaque, encontra-se o par cromossômico portador da Região Organizadora de Nucléolo (NOR).

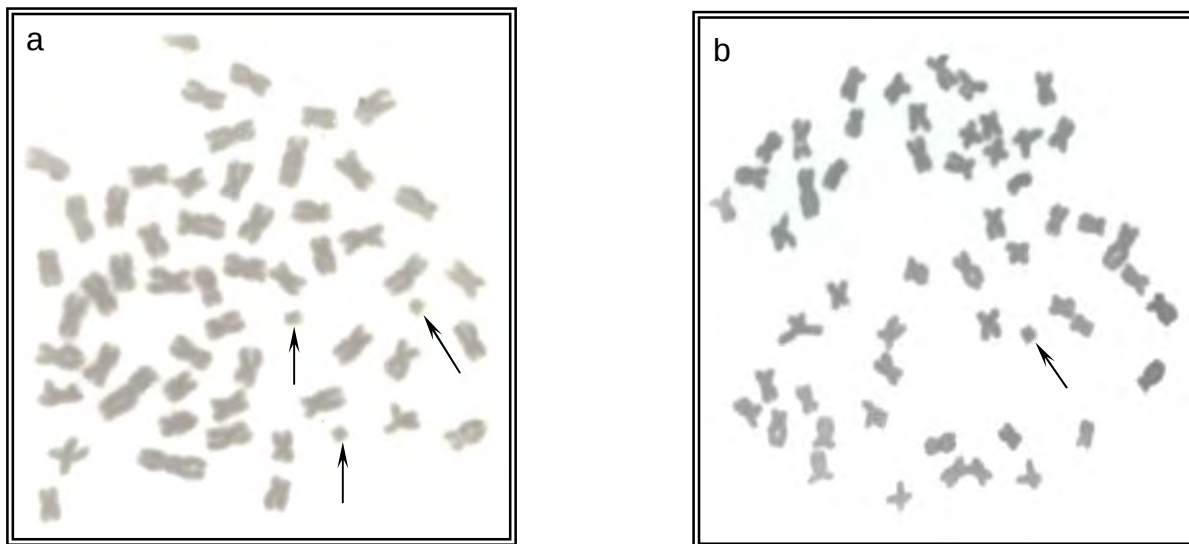


Figura 2. (a) Metáfase de *P. lineatus* exibindo três cromossomos supranumerários (apenas um exemplo de frequência de supranumerário, pois em todos os indivíduos desta espécie foi identificada sua ocorrência); Em **(b)** metáfase de *P. nigricans* evidenciando a presença de um único supranumerário.

Devido a esta diferença quanto à localização da Região Organizadora de Nucléolo em *P. argenteus* em relação aos outros indivíduos *Prochilodus* acima citados, realizamos a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com a utilização dos genes ribossomais 5S e 18S para confirmar se realmente havia diferença cariotípica relacionada ao gene 18S para *P. argenteus*. No entanto, observou-se uma condição de sintonia para estes dois genes em todos os exemplares analisados, inclusive para *P. argenteus* onde foi possível detectarmos a presença do gene ribossomal 18S em ambos os cromossomos homólogos correspondentes ao segundo par submetacêntrico não observado, anteriormente, pela simples impregnação por nitrato de Prata (figura 3a, b, c, d, e). Além disso, para todas as espécies analisadas, notou-se que a posição dos genes nos cromossomos correspondentes era idêntica, ou seja, o gene 5S (marcação verde) localizava-se próximo a região terminal do braço longo do cromossomo submetacêntrico e o gene 18S (marcação vermelha) em uma posição pericentromérica em sintonia com o gene 5S. Em nenhuma espécie estudada *clusters* correspondentes a estas sequências

ribossomais foram detectados, inclusive nos cromossomos B presentes no genoma de *P. lineatus* e *P. nigricans*.

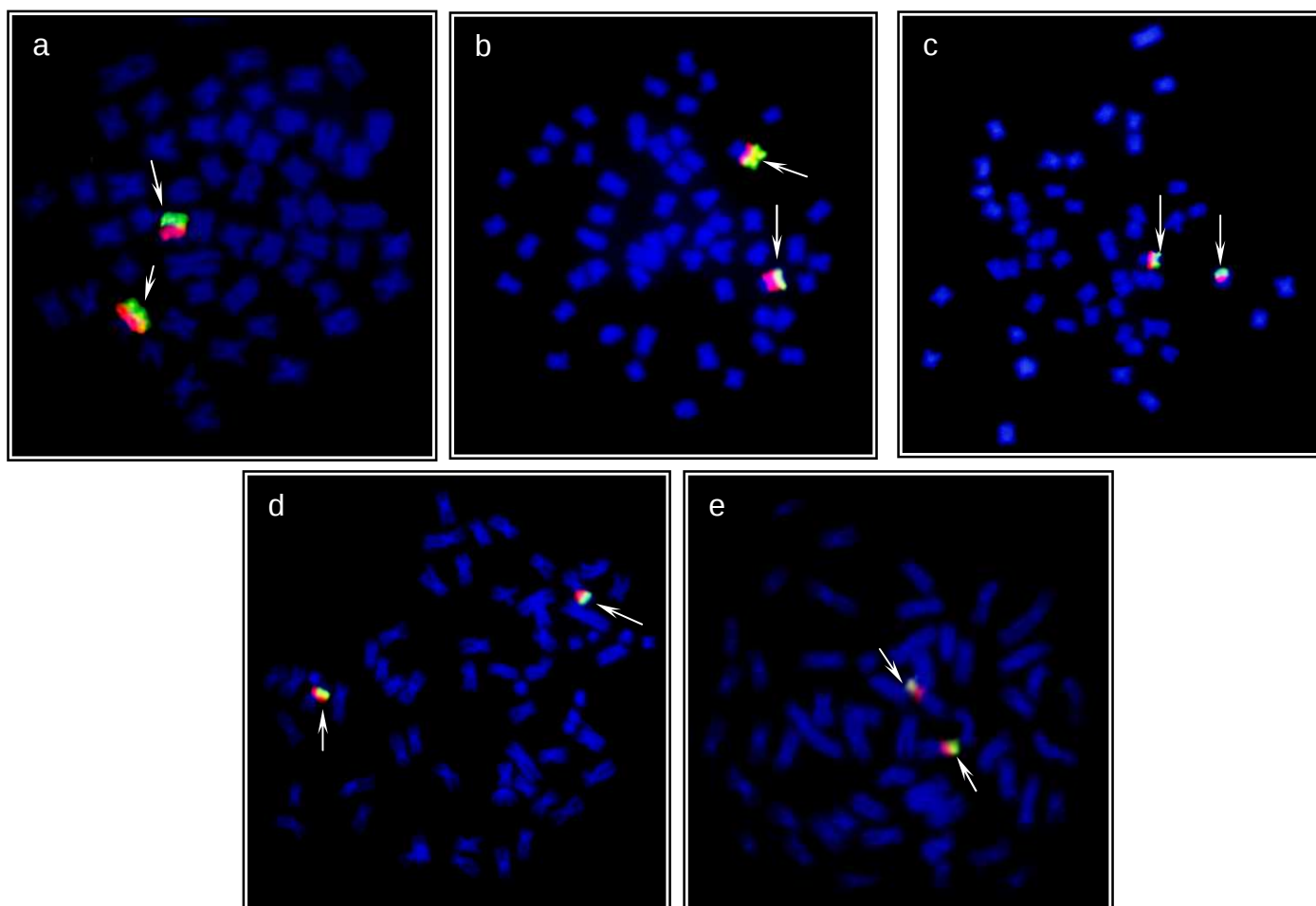


Figura 3. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) utilizando as sondas de DNAr 5S e 18S. Em **(a)** *P. argenteus*; em **(b)** *P. brevis*; em **(c)** *P. costatus*; em **(d)** *P. lineatus* com a presença de cromossomo supranumerário e em **(e)** *P. nigricans* com a presença de cromossomo supranumerário.

Por fim, utilizou-se a técnica de bandamento C na identificação do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva para todas as espécies analisadas. Os resultados apresentados quanto à localização dos blocos heterocromáticos nos permitiram diferenciar *Prochilodus lineatus* das outras quatro espécies de *Prochilodus* utilizadas neste trabalho. Blocos heterocromáticos conspícuos presentes somente na região centromérica dos cromossomos do conjunto padrão A foram observados em *P. lineatus* (figura 4d). Entretanto, para *Prochilodus argenteus*,

Prochilodus brevis, *Prochilodus costatus* e *Prochilodus nigricans* além da presença de regiões heterocromáticas no centrômero foi observado também um grande bloco heterocromático no braço longo do quinto par cromossômico (figura 4b, c, d, e). O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nos permitiu diferenciar os exemplares de *P. lineatus* das quatro espécies de *Prochilodus* presentemente estudadas. No entanto os supranumerários de *P. lineatus* e *P. nigricans* mostraram-se totalmente heterocromáticos (figura 4d, e).

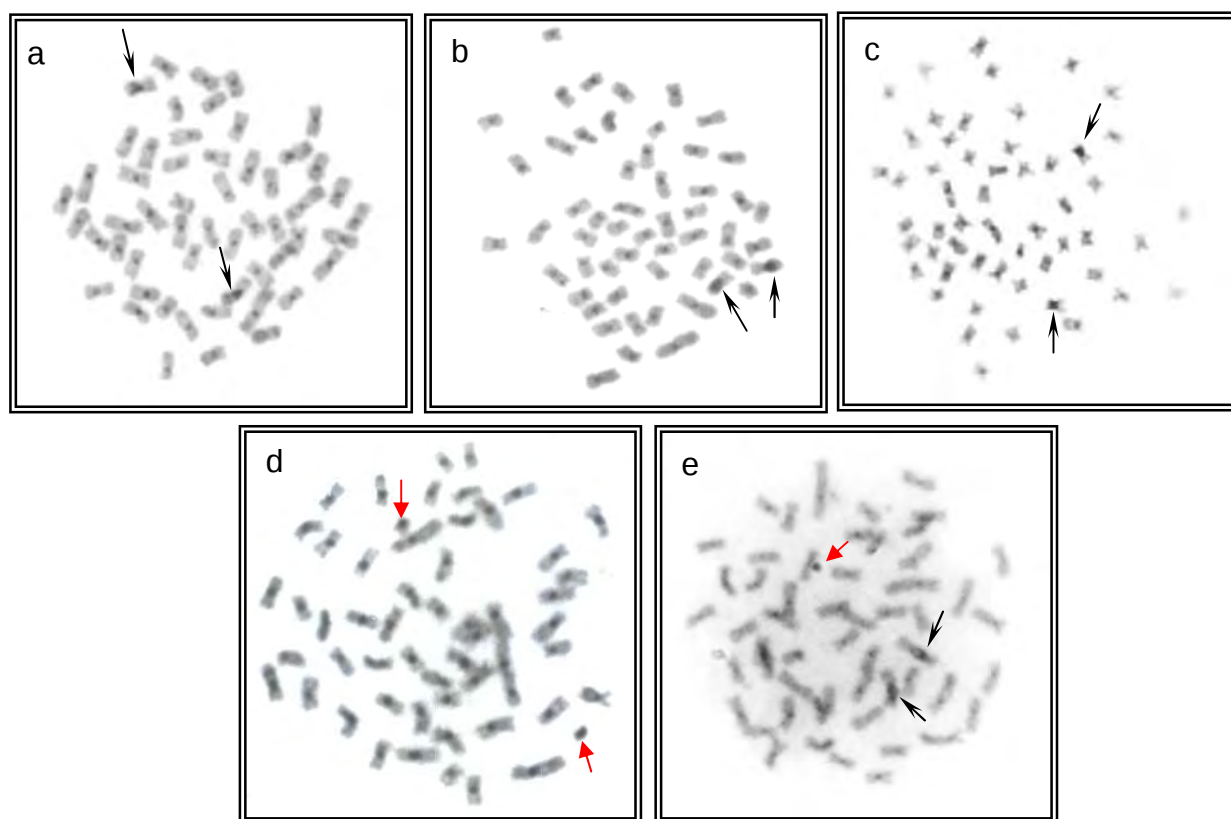


Figura 4. Distribuição do padrão de heterocromatina constitutiva em (a) *P. argenteus*; em (b) *P. brevis*; em (c) *P. costatus*; em (d) *P. lineatus* e em (e) *P. nigricans* . Em *P. lineatus* foi observado somente marcações da região centromérica de todos os cromossomos autossômicos. Todos os supranumerários mostraram-se heterocromáticos (setas vermelhas).

DISCUSSÃO

Estudos pioneiros realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990) sobre a citogenética de peixes do gênero *Prochilodus* sugeriram a existência de uma acentuada homogeneidade dos caracteres cariotípicos básicos. Vários trabalhos na literatura mostraram que exemplares de *Prochilodus* analisados citogeneticamente apresentaram $2n=54$ cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho 2003, Voltolin et al., 2009). Estes dados são condizentes com os resultados deste trabalho (figura 1a, b, c, d, e). Diante disso, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1990). No entanto, este conservadorismo cariotípico está restrito somente ao número e morfologia cromossômica.

A presença de microcromossomos supranumerários descrito para algumas espécies de *Prochilodus* nos permite realizar diversos estudos citogenéticos envolvendo aspectos concernentes a sua origem, evolução, estrutura e manutenção nos genomas hospedeiros. Primeiramente descrito em *P. lineatus* por Pauls e Bertollo (1983), os microcromossomos B também foram identificados em *P. brevis* (= *P. cearensis*) por Pauls e Bertollo (1990) com uma variação de até dois microcromossomos B. Venere et al. (1999) descreveram a ocorrência de um a dois cromossomos B em *P. nigricans*. Oliveira et al. (2003) identificaram a presença de até três cromossomos supranumerários em alguns indivíduos de *P. mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

A técnica de detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) tem sido extensivamente estudada em peixes e é considerada um excelente marcador genético, auxiliando nos estudos citotaxonômicos das espécies (Galetti Jr, 1998).

Os exemplares de *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans* estudados neste trabalho apresentaram somente um par de cromossomos portador da NOR localizado no braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico (figura 1b, c, d, e em destaque) conforme já descrito para estas espécies (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Hatanaka e Galetti Jr., 2004; Vicari et al., 2006; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009). No entanto, algo ainda não descrito para *P. argenteus* foi observado neste trabalho. Após a impregnação por nitrato de Prata apenas no braço longo de um cromossomo submetacêntrico foi evidenciada a NOR; seu homólogo, entretanto, não apresentou marcação alguma (figura 1a em destaque). Este resultado confronta com dados disponíveis na literatura para esta mesma espécie, pois segundo Hatanaka e Galetti Jr. 2004 a NOR simples é observada no segundo maior par de cromossomo submetacêntrico, algo não observado neste referido estudo.

Uma limitação apresentada pelo uso da técnica de NOR está no fato de que a Prata não se liga às regiões de DNAr, mas sim às proteínas associadas à estrutura nucleolar, limitando-se a identificar somente as NOR que estiverem ativas na interfase procedente (Miller et al., 1976). Esta é considerada a hipótese mais cabível para explicarmos esta única marcação para *P. argenteus*. Além disso, a inativação da NOR neste cromossomo não foi prejudicial ao funcionamento gênico nesta referida espécie, mas pode desencadear rearranjos cromossômicos muito significativos no processo evolutivo.

Para uma melhor investigação do posicionamento dos genes ribossomais foi utilizada a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com genes ribossômicos 5S e 18S. Estes foram observados em uma condição de sintonia em concordância com os dados observados anteriormente por Jesus e Moreira-Filho (2003), Hatanaka e Galetti Jr. (2004) e Vicari et al. (2006). Nenhum *cluster* adicional foi encontrado nos cromossomos desta espécie com relação ao gene 18S como observado por Maistro et al. (2000) e Vicari et al. (2006) e ao gene 5S descrito por Jesus e Moreira-Filho (2003) e por Vicari et al. (2006) ao estudarem exemplares de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu e da lagoa da Dourada, respectivamente.

A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação rara entre os vertebrados. Além da descrição em *P. lineatus* (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Vicari et al., 2006; Voltolin et al., 2009), esta sintonia também foi observada em *Salmo solar* (Pendás et al., 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Móran et al., 1996), *Astyanax* (Almeida-Toledo et al., 2002) e em anfíbios (Lucchini et al., 1993) e, recentemente, em *Pimelodus britskii* (Moraes Neto et al., 2011). Por outro lado, em várias espécies de peixes, este *loci* tem sido mapeado em distintos cromossomos (Martínez et al., 1996; Morán et al., 1996; Born e Bertollo, 2000; Ferro et al., 2001; Vicente et al., 2001; Wasko et al., 2001; Noletto et al., 2007), representando a condição mais frequente descrita para vertebrados (Lucchini et al., 1993; Drouin e Muniz de Sá, 1995; Suzuki et al., 1996).

A localização dos genes ribossomais 5S e 45S em distintos cromossomos podem representar vantagens quando comparadas à condição sintênica (Martins e Galetti, 1999). A sintonia entre os genes 45S e 5S facilita translocações causando interferências disruptivas na estrutura e função de outros genes (Martins, 2007). Em *Prochilodus argenteus*, a inatividade do gene 18S poderia estar associada a estas

translocações, no entanto, ainda é muito cedo para obtermos conclusões mais plausíveis quanto ao comportamento sintênico destes dois genes nesta espécie.

Genes ribossomais 5S ou 18S não foram localizados até o presente nos microcromossomos B de *P. lineatus*. (Jesus e Moreira-Filho, 2003). Incluindo os dados obtidos na análise dos exemplares desta mesma espécie e em *P. nigricans* realizados no presente trabalho.

A técnica de banda C tem se mostrado bastante útil nos estudos citogenéticos de peixes permitindo a identificação das regiões de heterocromatina constitutiva. Qualquer diferença na quantia ou distribuição de heterocromatina cromossomal pode ser identificada pela técnica de bandamento C, a qual é considerada um importante marcador em alguns grupos de peixes. Diferenças na distribuição de segmentos positivos de banda C podem caracterizar gêneros, espécies e populações (Montovani et al., 2000).

Vários estudos de bandamento C têm sido realizados na família Prochilodontidae. Frequentemente, exemplares do gênero *Prochilodus* são caracterizados por apresentarem blocos heterocromáticos conspícuos geralmente nas regiões centroméricas do complemento A e todos os cromossomos supranumerários nos indivíduos portadores são heterocromáticos (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al. 2006; Voltolin et al., 2009).

Neste trabalho observamos que o padrão de distribuição da heterocromatina no genoma de algumas espécies de *Prochilodus* estudadas difere entre si. Em *P. lineatus* a heterocromatina constitutiva foi observada somente nas regiões centroméricas dos cromossomos autossômicos (figura 4d) e todos os cromossomos B mostraram-se heterocromáticos. No entanto, em *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus* e *P. nigricans* além da marcação observada na região centromérica de

todos os cromossomos do conjunto padrão, também se constatou a presença de um grande bloco heterocromático no quinto par cromossômico (figura 4a, b, c, e). Esta característica incita a uma diferenciação dos *P. lineatus* quanto ao padrão de heterocromatina constitutiva com relação a outras espécies do gênero presentemente estudadas.

Vários estudos condizentes ao padrão de distribuição da heterocromatina em na família Prochilodontidae revelaram certas diferenciações entre as espécies. Oliveira et al. (2003) em um estudo envolvendo exemplares da família Prochilodontidae provenientes na bacia do rio Orinoco na Venezuela observaram que em *Prochilodus mariae* além da presença de heterocromatina constitutiva em todas as regiões centroméricas dos cromossomos autossômicos foi também evidenciado bloco heterocromático no quinto par de cromossomos submetacêntrico conforme observado em *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus* e *P. nigricans* neste presente trabalho. No entanto, Oliveira et al. (2003) neste mesmo estudo identificaram um padrão diferenciado de bandamento C entre *Semaprochilodus kneri* e *Semaprochilodus laticeps*. Na primeira espécie foi descrita a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centromérica de todos os cromossomos do conjunto A e também um bloco conspicuo heterocromático no braço longo do par cromossômico 24. Esta característica citogenética, entretanto, não foi observada em *S. laticeps*, pois somente nas regiões centroméricas foram constatadas a heterocromatina, conforme observado neste presente trabalho em *P. lineatus*.

Este padrão de heterocromatina presente somente nas regiões centroméricas dos cromossomos do conjunto padrão A em *P. lineatus* descrita neste trabalho difere dos dados publicados por Maistro et al. (2000) e Jesus e Moreira-Filho (2003) ao analisarem exemplares de *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu, mesmo local de nossa

coleta. Estes autores descrevem a presença de heterocromatina nas regiões centroméricas de todos os cromossomos autossômicos e na região telomérica de alguns pares de cromossomos do complemento A, algo não observado neste estudo. Esta diferenciação quanto ao padrão de bandamento C pode estar relacionada a alterações cromossômicas que esta referida espécie vem sofrendo ao longo dos anos, desencadeando mudanças sob o ponto de vista genético e evolutivo.

Entretanto, as quatro espécies estudadas (*P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus* e *P. nigricans*) apresentaram o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina e estão em conformidade com os dados presentes na literatura referentes a elas segundo Paul e Bertollo (1993); Venere et al. (1999); Hatanaka e Galetti Jr. (2004).

Segundo Pauls e Bertollo (1983, 1990) a família Prochilodontidae, especificamente o gênero *Prochilodus* apresenta uma estrutura cariotípica conservada, concomitantemente, resulta em uma evolução cromossômica conservativa. Na verdade, os dados deste presente trabalho concordam apenas em um conservadorismo quanto ao número e morfologia cromossômica para este grupo. Muitas alterações cromossômicas vêm ocorrendo ao longo dos anos seja referente às pequenas mudanças na posição da Ag-NOR ou no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva conforme observado. Estes rearranjos geralmente podem acarretar inversões paracêntricas que supostamente ocorrem durante o processo evolutivo das espécies conforme proposto por Feldberg et al. (1987).

CAPÍTULO 2

Neutralização dos cromossomos supranumerários
em *Prochilodus lineatus* detectada pelo
comportamento mitótico e meiótico

RESUMO

Os cromossomos B são alvos de grandes interesses na comunidade científica em geral, pois são elementos genéticos aparentemente dispensáveis, mas persistem na população e não são eliminados pela seleção natural. Estudos têm sido realizados no intuito de buscar informações sobre a função, origem, herança e manutenção destes elementos extras nos organismos portadores. Diante disso, o presente estudo visou contribuir para um melhor entendimento sobre o padrão de transmissão dos supranumerários em populações de *Prochilodus lineatus* selvagens e em cativeiro obtidas por meio de reprodução induzida e uma prévia análise do comportamento meiótico dos microcromossomos nesta mesma espécie. Estes cruzamentos foram realizados no CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP. Os dados obtidos sobre a taxa de transmissão dos B mostraram-se consistentes com a expectativa do comportamento meiótico regular ($K_B = 0.48$) seguindo um padrão de transmissão mendeliano ($K_B = 0.5$). Observou-se, portanto, um processo de não-acumulação destes cromossomos B, manifestado nas gerações filiais, pois tanto células mitóticas como meióticas apresentaram o mesmo número cromossômico. Estes resultados indicam que os cromossomos supranumerários presentes em *P. lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu encontram-se em uma fase de neutralização, porém muitas hipóteses surgem para explicar a futura manutenção destes elementos extras neste genoma.

INTRODUÇÃO

Os cromossomos B também denominados de acessórios ou cromossomos supranumerários representam um dos muitos casos de variação numérica descrita em mais de 1.300 espécies de plantas, 500 espécies de animais e em alguns fungos (Jones e Rees, 1982; Jones e Houben, 2003; Trivers et al., 2004). Jones e Pasakinskiene (2005) incluem os supranumerários no grupo de elementos gênicos egoístas como os transposons e exibem seus próprios mecanismos de perpetuação acarretando conflitos com o genoma hospedeiro. Esta relação denominada por Frank (2000) de co-evolução de conflito genômico é caracterizada pela capacidade de perpetuação dos cromossomos B através das gerações e a tentativa do genoma hospedeiro em eliminar ou suprimir os efeitos destes elementos extras. Tipicamente, os cromossomos B são transmitidos por um padrão não mendeliano devido à instabilidade mitótica e meiótica (Bidau et al., 2004; Camacho et al., 2000; Jimenez et al., 2000; Jones, 1991, 1995; Perfectti et al., 2004; Santos et al., 1993).

Embora possa ser constatado um aumento no conhecimento destes elementos estruturais do cariótipo das espécies, ainda pouco é sabido sobre sua estrutura, função e comportamento, o que torna difícil uma conclusão geral sobre sua importância para a espécie (Oliveira et al., 1997). Portanto, é essencial o conhecimento sobre os efeitos dos cromossomos B e seus mecanismos de herança no entendimento da importância de sua presença no genoma dos indivíduos portadores (Camacho et al., 1997; Camacho, 2005).

Vários estudos têm sido realizados concernentes à herança dos cromossomos B. Entretanto, quase todos os resultados demonstraram que estes elementos usualmente exibem um mecanismo de acumulação que explicaria sua

natureza parasítica (Jones, 1991). A variação no padrão de transmissão dos cromossomos B é um aspecto comum de herança, na qual a forma que estes são perdidos em algumas progênes e aumentada em número em outras é sempre comparada à expectativa Mendeliana (Chiavarino et al., 1998). Muitos cromossomos B registraram um padrão de transmissão claramente maior que 0.5, exibindo, desta forma, o mecanismo de acumulação que é a mais importante propriedade dos cromossomos B parasíticos. A acumulação pode ocorrer antes, durante e após a meiose (Jones, 1991).

Estudos concernentes à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes portadoras são ainda bastante escassos (Oliveira et al., 1997). Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração da herança paternal em ginogenético de *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995). Oliveira et al. (1997) e mais recentemente Voltolin et al. (2010a) realizaram uma análise inicial do padrão de herança dos cromossomos B em *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu por meio de cruzamentos dirigidos. O padrão de transmissão observado por ambos os autores foi consistente com a expectativa mendeliana ($K_B = 0.5$).

Com base nestas análises do padrão de herança dos cromossomos supranumerários em *P. lineatus*, o presente estudo visou uma análise do padrão de transmissão dos elementos B em *P. lineatus* por meio de cruzamentos dirigidos, seguida de uma observação do comportamento meiótico dos B, estabelecendo, desta maneira, relações de manutenção destes microcromossomos entre os elementos componentes de populações naturais e na piscicultura.

MATERIAL e MÉTODOS

Todos os exemplares de *Prochilodus lineatus* utilizados como reprodutores foram capturados em populações naturais do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo.

Após a análise citogenética dos exemplares, foram registradas as frequências dos cromossomos B e estes passaram a constituir a geração parental sendo mantidos nos tanques de reprodução do CEPTA/ICMBio Pirassununga, SP. Com base nos valores de frequência determinados, foram selecionados 16 indivíduos, 10 machos portadores de 1B a 6B e seis fêmeas, portadoras de 2B a 5B, formando 14 casais de reprodutores com diferentes combinações gaméticas, conforme exemplificado na figura 1. Após a elaboração dos cruzamentos destas matrizes realizou-se a reprodução artificial induzida nas dependências do CEPTA/ICMBio.

CASAL 1 Macho 1B X Fêmea 2B F₁ - Viveiro 16	CASAL 2 Macho 2B X Fêmea 2B F₁ - Viveiro 17
CASAL 3 Macho 3B X Fêmea 2B F₁ - Viveiro 19	CASAL 4 Macho 2B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 02
CASAL 5 Macho 1B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 04	CASAL 6 Macho 5B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 05
CASAL 7 Macho 3B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 01	CASAL 8 Macho 4B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 09
CASAL 9 Macho 6B X Fêmea 3B F₁ - Viveiro 03	CASAL 10 Macho 6B X Fêmea 4B F₁ - Viveiro 08
CASAL 11 Macho 2B X Fêmea 4B F₁ - Viveiro 07	CASAL 12 Macho 5B X Fêmea 5B F₁ - Viveiro 11
CASAL 13 Macho 6B X Fêmea 5B F₁ - Viveiro 12	CASAL 14 Macho 5B X Fêmea 4B F₁ - Viveiro 06

Figura 1. Matriz de cruzamentos envolvendo exemplares de *Prochilodus lineatus* (machos e fêmeas) identificados citogeneticamente a partir suas respectivas frequências de cromossomos supranumerários.

Os cruzamentos deram origem às 14 gerações filiais correspondente a um total de 252 indivíduos (figura 2). Estes foram estocados separadamente em tanques para crescimento e eventual sacrifício. Os animais provenientes da geração filial foram sacrificados ao atingirem um tamanho mínimo de cinco centímetros, para a confecção de preparações cromossômicas no intuito de analisar o padrão de transmissão dos cromossomos supranumerários.

CASAL 3 Macho 3B X Fêmea 2B F1 – 19 indivíduos	CASAL 4 Macho 2B X Fêmea 3B F1 – 9 indivíduos
CASAL 1 Macho 1B X Fêmea 2B F1 – 7 indivíduos	CASAL 2 Macho 2B X Fêmea 2B F1 – 17 indivíduos
CASAL 5 Macho 1B X Fêmea 3B F1 – 8 indivíduos	CASAL 6 Macho 5B X Fêmea 3B F1 – 19 indivíduos
CASAL 7 Macho 3B X Fêmea 3B F1 – 19 indivíduos	CASAL 8 Macho 4B X Fêmea 3B F1 – 27 indivíduos
CASAL 9 Macho 6B X Fêmea 3B F1 – 18 indivíduos	CASAL 10 Macho 6B X Fêmea 4B F1 – 13 indivíduos
CASAL 11 Macho 2B X Fêmea 4B F1 – 25 indivíduos	CASAL 12 Macho 5B X Fêmea 5B F1 – 21 indivíduos
CASAL 13 Macho 6B X Fêmea 5B F1 – 26 indivíduos	CASAL 14 Macho 5B X Fêmea 4B F1 – 24 indivíduos

Figura 2. Indivíduos resultantes dos cruzamentos dirigidos realizados com os 14 casais selecionados.

As preparações cromossômicas dos exemplares da geração parental foram obtidas por cultura de linfócitos utilizando o método descrito por Fenocchio e Bertollo (1988). As preparações cromossômicas das gerações filiais foram obtidas a partir fragmentos de tecido do rim anterior pelo método utilizado por Foresti et al. (1981).

Todos os parentais foram marcados com *tag* magnéticos segundo Porto-Foresti (2001) e mantidos em tanques no CEPTA/ICMBio para estudos posteriores.

Para o estabelecimento do número modal de B, foram analisadas 30 células com $2n=54$ cromossomos em cada indivíduo. O padrão de transmissão dos cromossomos B (K_B) foi investigado usando o teste Z segundo López-Léon et al. (1992).

No estudo do comportamento meiótico foram utilizados machos portadores de 5 cromossomos B, previamente caracterizados citogeneticamente. A técnica para obtenção de meiose consistiu em macerar em uma lâmina escavada, alguns pedaços das gônadas juntamente com uma ou duas gotas de ácido acético 45% ou 60%; com uma pipeta *Pasteur* foi colocada (não pingar) uma gota sobre a lâmina e em seguida aspirada. Este processo foi repetido em várias regiões da lâmina. Posteriormente, estas foram secas em uma placa de metal a temperatura de 35° a 40° e coradas com Giemsa 5%. Todas as preparações de meiose foram analisadas e fotografadas no fotomicroscópio Olympus, modelo BX 50.

RESULTADOS

Todos os exemplares da geração filial foram sacrificados para a obtenção das preparações citogenéticas as quais foram utilizadas no estudo da herança dos supranumerários. Após análise dos 252 indivíduos foi constatado um número diploide de 54 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico para todos os exemplares analisados. No entanto, a frequência dos cromossomos B mostrou-se variável (figura 3). A geração filial proveniente do casal 1 ($2B_{\text{♀}} \times 1B_{\text{♂}}$) era composta por 7 indivíduos onde 4 animais apresentaram 1 cromossomo B (57%) e 3

exemplares tinham 2B (43%). A geração filial do casal 2 (2B♀X2B♂) era composta por 17 indivíduos onde 7 animais apresentaram 1 cromossomo B (41.3%), 4 exemplares tinham 2B (23.5%), 4 exemplares possuíam 3B (23.5%) e apenas 2 animais possuíam 4B (11.7%). A geração filial do casal 3 (2B♀X3B♂) era composta por 19 indivíduos dos quais apenas 2 apresentaram 1B (10.5%), 7 animais portaram 2 cromossomos B (37%), 5 exemplares apresentaram 3B (26.3%), 3 exemplares com 4B (15.8%), 1 indivíduo com 5B (5.2%) e apenas 1 animal com 6 cromossomos supranumerários (5.2%). A geração filial do casal 4 (3B♀X2B♂) era composta por 9 indivíduos dos quais 6 animais portaram 2B (66.7%), 2 exemplares apresentaram 3B (22.2%) e 1 indivíduo tinha 4B (11.1%). A geração filial do casal 5 (3B♀X1B♂) era composta por 8 indivíduos dos quais 2 animais portaram 1B (25%), 5 exemplares apresentaram 2B (62.5%) e 1 indivíduo tinha 3B (12.5%). A geração filial do casal 6 (3B♀X5B♂) era composta por 19 indivíduos do qual 1 apresentou 2B (5.4%), 6 animais portaram 3 cromossomos B (31.5%), 5 exemplares apresentaram 4B (26.3%) e 7 exemplares com 5B cada (36.8%).

A geração filial do casal 7 (3B♀X3B♂) era composta por 19 indivíduos dos quais 2 apresentaram 1B (10.5%), 4 animais portaram 2 cromossomos B (21%), 8 exemplares apresentaram 3B (42.1%), 3 exemplares com 4B (15.9%) e 2 animais com 5B cada (10.5%). A geração filial do casal 8 (3B♀X4B♂) era composta por 27 indivíduos dos quais 1 apresentara 1B (3.7%), 6 animais portaram 2 cromossomos B (22.1%), 14 exemplares apresentaram 3B (52%), 3 exemplares com 4B (11.1%) e 3 indivíduo possuíam 5 cromossomos B (11,1%). A geração filial do casal 9 (3B♀X6B♂) era composta por 18 indivíduos dos quais 1 apresentara 1B (5.5%), 1 animal portara 2 cromossomos B (5.5%), 5 exemplares apresentaram 3B (27.7%), 6 exemplares com 5B (33.6%), 4 indivíduos com 6B (22.2%) e apenas 1 animal com 7

cromossomos supranumerários (5.5%). A geração filial do casal 10 (4B♀X6B♂) era composta por 13 indivíduos dos quais 4 apresentaram 3B (30.7%), 2 animais portaram 4 cromossomos B (15.4%), 6 exemplares apresentaram 5B (46.2%) e 1 exemplar com 8B (7.7%).

A geração filial do casal 11(4B♀X2B♂) era composta por 25 indivíduos dos quais 2 apresentaram 1B (8%), 10 animais portaram 2 cromossomos B (40%), 8 exemplares apresentaram 3B (32%) e 5 exemplares com 4B (20%). A geração filial do casal 12 (5B♀X5B♂) era composta por 21 indivíduos dos quais 2 apresentaram 3B (9.5%), 3 animais portaram 4 cromossomos B (14.2%), 10 exemplares apresentaram 5B (47.8%) e 6 exemplares com 6B (28.5%). A geração filial do casal 13 (5B♀X6B♂) era composta por 26 indivíduos dos quais 2 apresentaram 3B (7.6%), 3 animais portaram 4 cromossomos B (11,7%), 13 exemplares apresentaram 5B (50%), 4 exemplares com 6B (15.5%), 1 indivíduo com 7B (3.8%), 2 animais apresentaram 8B (7.6%) e apenas 1 animal com 9 cromossomos supranumerários (3.8%). A geração filial do casal 14 (4B♀X5B♂) era composta por 24 indivíduos dos quais 1 indivíduo não apresentou cromossomo supranumerário (4.2%), 3 animais portaram 2 cromossomos B (12.5%), 3 exemplares apresentaram 3B (12.5%), 10 exemplares com 4B (41.6%) e 7 animal com 5 cromossomos supranumerários (29.2%).

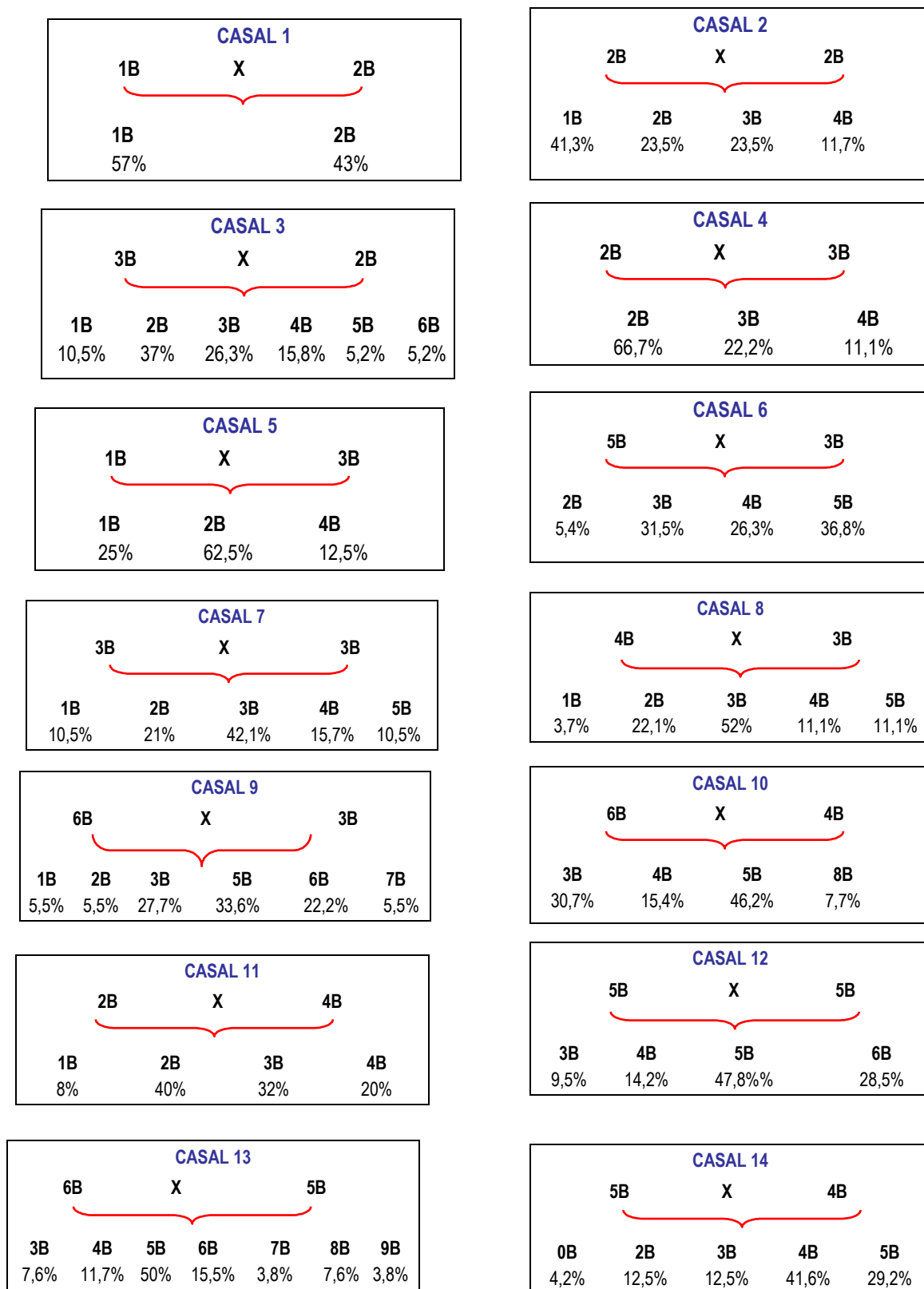


Figura 3. Proporção de cromossomos B manifestada nas gerações filiais de cada cruzamento.

No estudo da taxa de transmissão dos cromossomos supranumerários utilizou-se o teste estatístico denominado teste Z, de acordo com López-Léon et al. (1992). Nos 14 cruzamentos controlados observou-se uma taxa de transmissão mendeliana ($K_B = 0.48$) (tabela 1), em ambos os sexos apresentando, uma intrínseca relação com a teoria mendeliana ($K_B = 0.5$).

Tabela1. Padrão de transmissão dos cromossomos B nos cruzamentos controlados da espécie *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu. (K_B , padrão de transmissão dos cromossomos B; valores de Z maior que +1,96 indica acumulação dos cromossomos B e valores de Z menor que -1,96 indica eliminação

Tipos de Cruzamentos Número de espécies da geração filial com número modal de cromossomos B

	♀	♂	VIVEIRO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL	MÉDIA DE B	K_B	Z	P
C1	2	1	16		4	3								7	1.4285	0.4761	-0.1265	NS
C2	2	2	17		7	4	4	2						17	2	0.5147	0.1212	NS
C3	2	3	19		2	7	5	3	1	1				19	2.8421	0.5684	0.5963	NS
C4	3	2	2			6	2	1						9	2.444	0.4888	-0.0672	NS
C5	3	1	4		2	5	1							8	1.875	0.4687	-1	NS
C6	3	5	5			1	6	5	7					19	3.9473	0.4934	-0.0575	NS
C7	3	3	1		2	4	8	3	2					19	2.9473	0.4912	-0.076	NS
C8	3	4	9		1	6	14	3	3					27	3.037	0.4338	-0.6881	NS
C9	3	6	3		1	1	5		6	4	1			18	4.3888	0.4876	-0.1052	NS
C10	4	6	8				4	2	6				1	13	4.4615	0.4461	-0.3888	NS
C11	4	2	7		2	10	8	5						25	2.64	0.44	-0.6	NS
C12	5	5	11				2	3	10	6				21	5.0952	0.5095	0.087	NS
C13	5	6	12				2	3	13	4	1	2	1	26	5.28	0.48	-0.2	NS
C14	4	5	6	1		3	3	10	7					24	3.75	0.4166	-0.8176	NS
														252	3.5	0.48		

A taxa de transmissão mendeliana dos cromossomos B demonstra claramente, a ausência de mecanismos de acumulação supranumerários nos *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, pois os dados estão em concordância com o fato de que a média ponderada do número de B na progênie F1 analisada (3.523) não difere significativamente da observada nos 16 adultos (3.125) usados como parentais (tabela 2). O mesmo pode ser observado ao calcular a carga de cromossomos B

onde parentais (3.125) e respectivas gerações filiais (3.513) não apresentaram diferenças significativas conforme observado na tabela 3.

Tabela 2. Média da frequência dos cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus*, parentais e geração F1

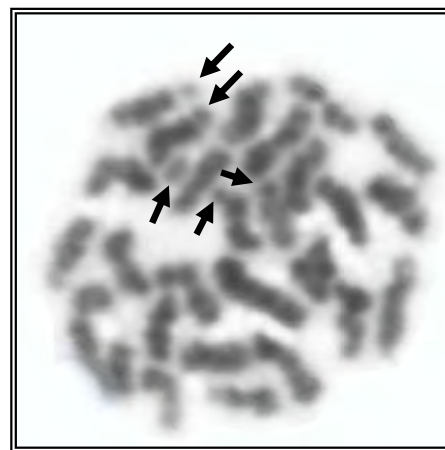
	Número de indivíduos com										Total	Média de B
	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B		
Parental		1	5	5	2	2	1				16	3.125
F1	1	21	50	63	40	55	16	2	3	1	252	3.523

Tabela 3. Média da carga dos cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus*, parentais e geração F1

	Número de indivíduos com										Total	Média de B
	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B		
Parental		1	5	5	2	2	1				16	3.125
F1	1	21	50	63	40	55	16	2	3	1	251	3.513

No estudo sobre o comportamento meiótico dos supranumerários em *Prochilodus lineatus* foi constatado que o mesmo número de B que compõe as células mitóticas também está presente nos gametas destes animais. Os exemplares analisados neste presente estudo apresentavam 5 cromossomos B tanto em suas células mitóticas como nas meióticas conforme observado na figura 5. Este resultado demonstrou estabilidade entre as células mitóticas e meióticas nos indivíduos portadores de B em *P. lineatus* confirmando um padrão de não-acumulação de B no genoma hospedeiro, ou seja, este trabalho comprovou o padrão de neutralização dos supranumerários para esta espécie.

Figura 5. Célula meiótica de *P. lineatus* evidenciando a presença de 5 cromossomos B (setas).



DISCUSSÃO

Mecanismos de transmissão dos B podem ser estudados por dois diferentes métodos, seja por cruzamentos controlados (Hewitt, 1973; Cano e Santos, 1989; López-Léon et al. 1992) ou por observações citológicas de meiose de machos e fêmeas (Heriques-Gil et al. 1989). Neste presente trabalho foi realizado um estudo pormenorizado do padrão de herança dos supranumerários por meio da utilização da reprodução induzida envolvendo 16 reprodutores (10 machos e seis fêmeas) os quais resultaram em 14 gerações filias com as mais variadas frequências de supranumerários. A partir destes cruzamentos observou-se uma taxa de transmissão mendeliana quanto à herança dos elementos B nesta referida espécie. Estes dados nos permitiram concluir que os supranumerários em *Prochilodus lineatus* encontram-se em estágio de neutralização conforme proposto por Camacho (2000) e previamente confirmado por Oliveira et al. (1997) e Voltolin et al. (2010b) em populações selvagens curimbatás do rio Mogi-Guaçu e em cativeiro obtidas por reprodução induzida.

De acordo com a presença de mecanismos de acumulação e seus possíveis efeitos, dois modelos de equilíbrio podem ser mencionados. O modelo heterótico aponta para um balanço entre os efeitos positivos dos cromossomos B nas formas

hospedeiras, quando eles ocorrem em baixo número e efeitos negativos quando eles ocorrem em alto número (White, 1973). O modelo parasítico proposto por Östergren (1945) e Nur (1966a, b, 1977), ou modelo egoísta definido por Jones (1985) e Shaw e Hewitt (1990), assume que os cromossomos B são mantidos na população por meio de mecanismos de acumulação, os quais contrabalanceiam seus efeitos deletérios no genoma hospedeiro.

Recentemente, um modelo de não equilíbrio da evolução dos cromossomos B a longo prazo foi proposto por Zurita et al. (1998). De acordo com este modelo, um cromossomo B parasítico ao perder seu mecanismo de acumulação, estará destinado a desaparecer, quer de modo rápido, lento ou muito lentamente da população, em um longo processo de extinção ao acaso, alcançando, desta forma, um estágio de neutralização. Diante disso, uma nova variante de cromossomo B poderia aparecer e reiniciar o ciclo (Herrera et al., 1996).

Condições de acúmulo, neutralização e extinção dos B estão relacionadas ao seu modo de transmissão entre as gerações portadoras. O aumento da instabilidade meiótica acarreta acúmulo destes elementos extras na natureza e todo o acúmulo é devido a um padrão de transmissão acima da perspectiva mendeliana. No entanto, se os cromossomos B atingirem uma estabilidade meiótica, o padrão de transmissão deverá ser coerente com a expectativa mendeliana, repercutindo na fase de neutralização conforme observado neste trabalho. Por fim, se registrada uma diminuição da frequência dos elementos B nas gerações, seu padrão de transmissão encontrar-se-á abaixo da expectativa mendeliana, favorecendo a extinção destes elementos na população portadora.

Bakkali et al. (2002) analisaram a herança dos cromossomos B em populações de gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, a partir da expectativa mendeliana ($K_B = 0.5$). O

padrão de transmissão dos cromossomos B_1 (originários da população ibérica) de fêmeas desta referida espécie em três diferentes populações marroquinas, Mechra (próxima a Mechra-bel-Ksiri); SO.DE.A. (próxima a Ksar-el-Kebir) e Simir (entre Ceuta e Tetouan). Após a realização dos cruzamentos dirigidos, constataram que a transmissão dos cromossomos B_1 da população de Mechra apresentou-se em acúmulo ($K_B=0.575$) com relação à expectativa mendeliana. Entretanto, esta acumulação não foi observada nas outras duas populações, onde SO.DE.A. apresentou uma transmissão de ($K_B=0.512$) e Smir ($K_B=0.463$). Estes dados confirmaram a existência de diferentes estágios evolutivos para o mesmo cromossomo B em diferentes populações. Sob o modelo de evolução a longo prazo, a população de Mechra apresentou o polimorfismo B_1 mais jovem no Marrocos, onde ainda se observa um acúmulo deste tipo de cromossomo supranumerário através das gerações. Nas duas populações de gafanhotos o processo de transmissão dos cromossomos B_1 mostrou-se neutralizado, seguindo desta forma um padrão mendeliano (Bakkali et al., 2002).

Após o cálculo da média da frequência de cromossomos B e também de sua respectiva carga nos reprodutores e em suas respectivas gerações filiais (tabelas 2 e 3) observamos que não houve diferenças significativas quanto presença de B em ambos os genoma, conforme já observado por Oliveira et al. (1997) nesta mesma população de curimbatás. Diante disso, podemos concluir que os supranumerários em *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu está em um processo de não-acumulação e até mesmo podemos supor uma possível hipótese de extinção, caso não haja formações de novas variantes de B conforme o modelo proposto por Zurita et al. (1998).

O comportamento meiótico dos cromossomos B tem sido extensivamente estudado em plantas e insetos (Jones e Rees, 1982), no entanto, estudos em mamíferos são escassos (Kolomiets et al., 1988; Shi et al., 1988). Nos diversos estudos concernentes ao comportamento meiótico dos supranumerários sempre se observou um índice de instabilidade mitótica dos B (MI) conforme descrito para *Vulpes vulpes* por (Switonsky et al. 1987). A presença da instabilidade mitótica pode dificultar a análise da taxa de transmissão dos supranumerários, pois o número de B é variável para cada célula seja ela mitótica ou meiótica. Diante disso, surgem incertezas quanto ao padrão de transmissão dos supranumerários às gerações filiais, pois toda instabilidade resulta em acúmulo de B. No entanto, no presente estudo, confirmamos um estágio neutro de frequência dos B em populações de *P. lineatus*, ou seja, a ausência de instabilidade mitótica (MI=0) resulta em um estágio de neutralização, onde o número de B presente nas células somáticas é o mesmo observado nas células germinativas (figura 5). Este estágio neutro revela um comportamento não parasítico dos supranumerários no genoma desta espécie estudada. Diante destes resultados, podemos levantar duas hipóteses sobre a manutenção dos B em *Prochilodus lineatus*, a primeira refere-se à formação de uma nova variante de B que possa surgir ao longo dos anos resultantes de modificações na estrutura de seu DNA o qual se tornará novamente em um invasor parasítico desencadeando acúmulos de B no genoma hospedeiro e uma segunda hipótese onde os cromossomos B em seu estágio neutro se tornariam elementos heteróticos trazendo benefícios aos indivíduos portadores. Por fim, estes elementos extras poderiam ser eliminados do genoma pelo próprio mecanismo de controle celular.

Muitas são as teorias que tentam explicar a manutenção e o futuro dos supranumerários nos organismos vivos, no entanto, muito ainda deve ser observado

sobre a dinâmica dos supranumerários para alcançarmos conclusões plausíveis sobre sua existência e manutenção nos hospedeiros.

CAPÍTULO 3

Primeira evidência do elemento retrotransponível Rex1
e das histonas H3 e H4 em *Prochilodus lineatus* e
Prochilodus nigricans, espécies portadoras de
supranumerários

RESUMO

Uma característica diferencial de algumas espécies de *Prochilodus* é a presença dos cromossomos supranumerários em seus genomas. Os cromossomos B são considerados umas das maiores incógnitas da citogenética e muitos estudos vêm sendo realizados no intuito de decifrar, principalmente, sua origem. DNA repetitivos, diversas famílias multigênicas como as histonas e DNA ribossômico associados à FISH têm sido utilizados na elucidação deste enigma. Diante disso, o presente trabalho visou contribuir para o entendimento da origem e estrutura dos supranumerários por meio de mapeamentos cromossômicos utilizando as sondas Rex1 e as histonas H3 e H4 em espécies de *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*, ambas portadoras de B. Após a Hibridação *in situ* Fluorescente utilizando Rex1 e H3 observou-se um padrão disperso destas sequências gênicas por todos os cromossomos A das duas espécies utilizadas, no entanto, os supranumerários exibiram diferentes graus de homologia com a sonda Rex1, porém todos foram hibridados. No entanto, a histona H3 esteve presente na maioria dos B em diferentes graus de homologia e, poucos B não apresentaram marcações com esta sonda. Marcações da histona H4 foram evidenciadas somente no braço curto do quarto par de cromossomo submetacêntrico para ambos os exemplares e nenhum cromossomo B foi marcado hibridado. Apesar dos cromossomos supranumerários exibirem marcações correspondentes às sequências Rex1 e H3 é praticamente impossível associar sua origem a um ou mais pares cromossômicos A devido ao alto grau de dispersão destas sequências nos cromossomos A e B. Por fim, as diferenças de homologias confirmam a particularidade que cada cromossomo B apresenta até mesmo dentro do próprio genoma.

INTRODUÇÃO

Os cromossomos B não contêm informações genéticas consideradas vitais para a sobrevivência dos organismos portadores (Jones e Rees, 1982). Considerados cromossomos dispensáveis, os supranumerários podem causar um impacto neutro ou levemente negativo (Puertas, 2002; Jones e Houben, 2003) e em sua maioria são altamente heterocromáticos, refletindo sua natureza pobre em genes ativos (Han et al., 2007). No entanto, a estrutura, função e ação destes cromossomos extras são particulares nos diferentes grupos, tornando-se difícil alcançar uma conclusão geral sobre sua importância para as espécies portadoras (Oliveira et al., 1997).

Elementos retrotransponíveis são capazes de realizarem importantes funções na evolução do genoma (Kidwell e Lisch, 2000). Estes aumentam seus números de cópias por retrotransposição e podem ser substrato para recombinações homólogas em várias categorias de rearranjos de DNA incluindo deleções, inversões, translocações, duplicações e amplificações (Ozouf-Costaz, et al., 2004), desencadeando o surgimento de polimorfismos que resultam na variabilidade do número de cópias dentro e entre as espécies, promovendo trocas na estrutura e expressão gênica (Capy et al., 1998).

Resultados de estudos com DNA repetitivos são de grande valia no entendimento da origem e evolução dos cromossomos sexuais e supranumerários. A constante presença de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais e supranumerários em espécies de peixes indica que tais sequências de DNA exercem um papel importantíssimo na evolução destes genomas (Martins, 2007).

As histonas H3 e H4 são bastante conservadas nos genomas dos eucariotos (Miller et al., 1993). De acordo com Cabrero et al. (2009) a família das histonas é

considerada um excelente modelo para estudos de mapeamento cromossômico, porém esta ainda tem sido utilizada em poucos organismos a partir da Hibridação *in situ* Florescente. Somente em alguns mamíferos, anfíbios, peixes, moluscos e insetos (Graves et al., 1985; Tripputi et al., 1986; Turner et al., 1988; Hankeln et al., 1993; Pendás et al., 1994; Ranz et al., 2003; Zhang et al., 2007; Cabrero et al., 2009; Cabral-de-Mello et al., 2010a, 2011a, 2011b) há registros da utilização das histonas como marcadores citogenéticos. Em peixes um estudo pioneiro foi realizado por Pendás et al. (1994), onde descreveram a localização das histonas H1 e H4 em três espécies de truta. Recentemente, Hashimoto et al. (2011) reportaram o mapeamento gênico da histona H1 relacionando-a com a distribuição de *clusters* de DNAr 5S em três espécies de *Astyanax* (*Astyanax fasciatus*, *Astyanax altiparanae* e *Astyanax bockmanni*). No entanto, muito ainda deve ser feito nos estudos de evolução cromossômica e organização genômica utilizando-se destas famílias multigênicas em outras espécies de peixes neotropicais.

A organização em *clusters* de famílias multigênicas ou outras sequências de DNA repetitivo tem sido uma importante ferramenta na análise da evolução cariotípica, estrutura genômica, origem e evolução dos cromossomos B em animais e plantas portadoras (Cabrero et al., 2003; Teruel et al., 2010).

Perante aos raros trabalhos condizentes a localização dos elementos retrotransponíveis e das famílias multigênicas das histonas no genoma de peixes, especialmente nos supranumerários, o presente estudo descreve o isolamento e o mapeamento do elemento retrotransponível Rex1 e das histonas H3 e H4 por meio da Hibridação *in situ* Florescente (FISH) nas diferentes frequências de supranumerários em *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*. Os resultados são

discutidos sob o enfoque do entendimento da organização e evolução destas sequências nos cromossomos B nestas duas espécies portadoras.

MATERIAIS e MÉTODOS

Foram utilizados 50 exemplares de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) coletados em populações selvagens do rio Mogi-Guaçu, bacia do Paraná, Pirassununga, SP, Brasil e também indivíduos desta mesma espécie resultantes de reprodução induzida, no intuito de mapear os elementos retrotransponíveis Rex1 e a histona H3 em todas as frequências de cromossomos supranumerários descritas para esta espécie. Foram coletados 17 exemplares de *Prochilodus nigricans* (Spix e Agassiz, 1829) provenientes do rio Araguaia (TO), bacia Tocantins-Araguaia, Brasil.

As preparações cromossômicas foram obtidas pelo método de estimulação de mitoses (Lozano et al., 1988; Oliveira et al., 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti et al., 1993) e preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al., 1981).

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) utilizando sonda do retrotransposon Rex1 obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico de *P. lineatus* utilizando os *primers* 1 - RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGGCCTTCAACACC-3') e RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3'). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 11.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0.5 µl de cada primer (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.5 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas

seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 34 ciclos a 95°C (30s), 56°C (30s) e 72°C (20s) com extensão final de 72°C por 5 minutos.

As sondas histônicas H3 e H4 foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de amplificações do DNA genômico de *Prochilodus lineatus* com os seguintes *primers* H3aF (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC) e H3aR (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC) (Colgan et al.,1998). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 17.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Biotina-11-dUTP, 0.5 µl de cada primer (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 30 ciclos a 94°C (15s), 48°C (15s) e 72°C (15s) com extensão final de 72°C por 7 minutos. Gene da histona H4 foi amplificado com *primers* universais H4F2s (5'-TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C) e H4F2er (5'-CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT) (Pineau et al., 2005). Esta sonda foi marcada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando 17.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0.5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0.2 µl de dTTP (2mM cada), 0.8 µl de Biotina-11-dUTP, 0.5 µl de cada primer (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de marcação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 30 ciclos a 94°C (20s), 58°C (20s) e 72°C (30s) com extensão final de 72°C por 7 minutos.

As sondas foram desnaturadas em formamida 70% (2XSSC), por 5 min. O DNA foi hibridado a 37°C *overnight* em câmara úmida (1mg de sonda desnaturada, formamida 50%, 10mg/ml de sulfato de dextrano e 5mg/ml de DNA de esperma de salmão). A sonda Rex1 hibridada foi detectada por reação anti-digoxigenina

associada à rodamina e as sondas H3 e H4 foram detectadas por reações avidina associada à FITC. As lâminas foram contraincorada com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) e fotografadas com fotomicroscópio de fluorescência (BX 61, Olympus) equipado com câmera digital refrigerada Olympus DP70, utilizando o software Pro MC 6.0.

RESULTADOS

Os exemplares de *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans* analisados citogeneticamente apresentaram uma constituição cariotípica de $2n=54$ cromossomos (capítulo 1). Além disso, por meio da análise cromossômica foi observada a presença de cromossomos supranumerários em *P. lineatus* com frequência de um a nove B (anexo 1) e em *P. nigricans* onde somente um indivíduo apresentou um único elemento extra (capítulo 1).

Análises por meio da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com a utilização da sonda do retrotransposons Rex1 em preparações cromossômicas de *P. lineatus* e *P. nigricans* ambos portadores de supranumerários foi evidenciado um padrão disperso de Rex1 por todo o genoma do complemento A. Além disso, a presença de pequenos *clusters* nas regiões teloméricas e centroméricas destas duas espécies foi considerada uma característica comum (figuras 1 e 2). A presença destes *clusters* principalmente nas regiões centroméricas são coincidentes com o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, anteriormente observada por bandamento C nestas mesmas espécies (capítulo 1).

Nas diferentes frequências de supranumerários em *P. lineatus* a sonda Rex1 exibiu padrões dispersos, porém em graus diferenciados de homologias em todos os

supranumerários (figura 1a, b, c, d, e, f, g, h, i), ou seja, alguns B foram totalmente marcados pela sonda e outros se mostraram homólogos em algumas regiões. Em *P. nigricans* o único cromossomo B também exibiu um padrão disperso para Rex1 (figura 2). Todos os supranumerários destas duas espécies apresentaram homologia com o elemento retrotransponível Rex1 e em sua maioria também foram observados pequenos *clusters* predominantemente em suas regiões teloméricas (figuras 1 e 2).

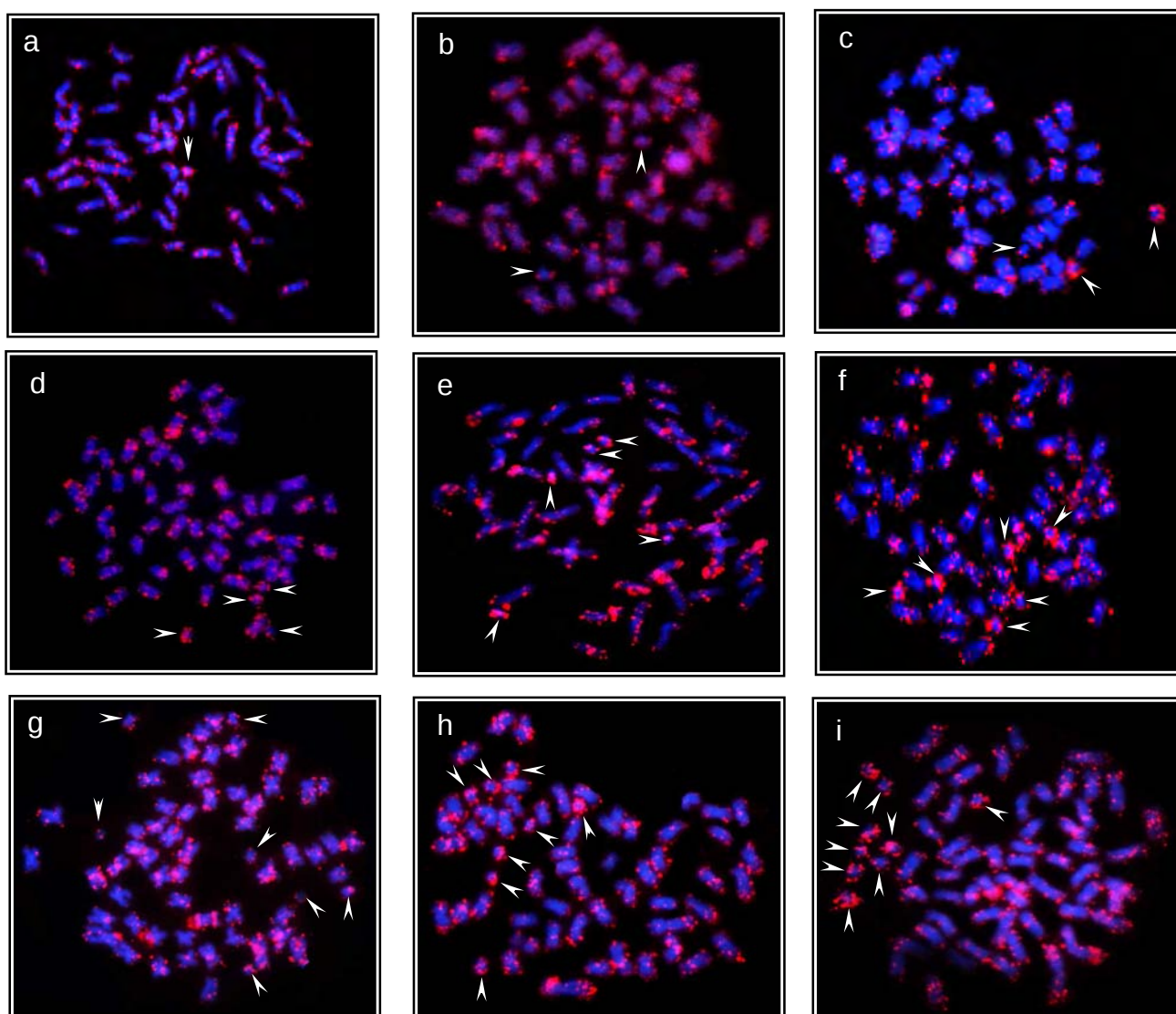
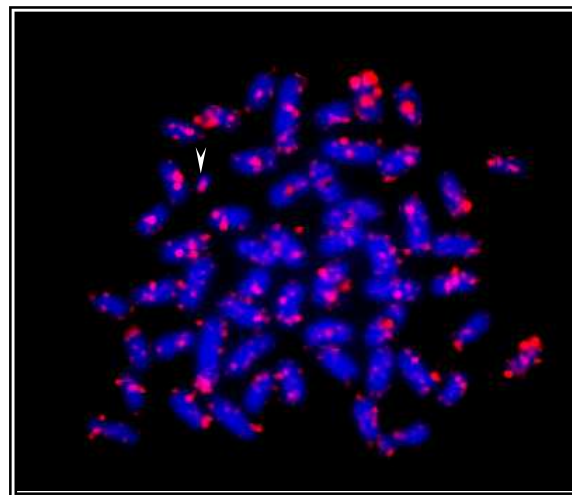


Figura 1. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda do elemento retrotransposons Rex1 em metáfases de *P. lineatus* com frequências de um a nove cromossomos supranumerários. (setas indicam os cromossomos B em seus diferentes graus de homologia com a sonda).

Figura 2. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda do elemento retrotransposons Rex1 em metáfase de *P. nigricans* com um cromossomo supranumerário. (seta indica o cromossomo B).



A utilização da sonda da histona H3 em diferentes frequências de cromossomos B de *P. lineatus* exibiu um padrão diferenciado de homologia, ou seja, alguns supranumerários apresentaram marcações dispersas por todas as cromátides, outros demonstraram pequenas marcações principalmente nas regiões teloméricas e, ainda observou-se cromossomos B sem nenhuma marcação referente a esta sonda (figura 3a, b, c, d, e, f, g, h, i). Este resultado demonstrou que os cromossomos B de *P. lineatus* em suas diferentes frequências exibem suas particularidades até dentro de um mesmo genoma. O único cromossomo B de *P. nigricans* (figura 4) mostrou homologia com a sonda exibindo também um padrão disperso, conforme observado na maioria dos supranumerários em *P. lineatus*. Tanto em *P. lineatus* como em *P. nigricans* o padrão da histona H3 encontrou-se disperso por todo o genoma autossômico (figuras 3 e 4).

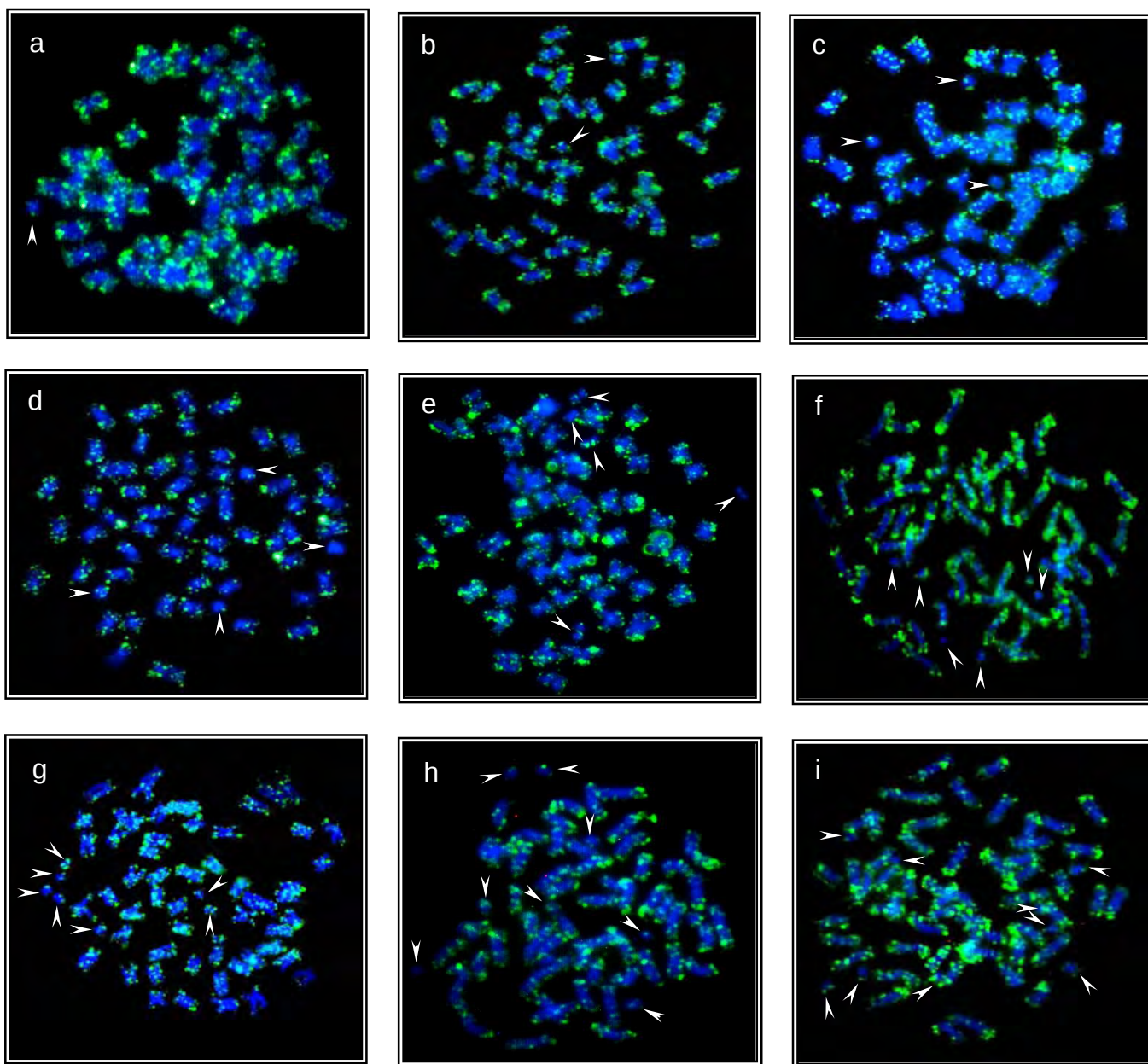
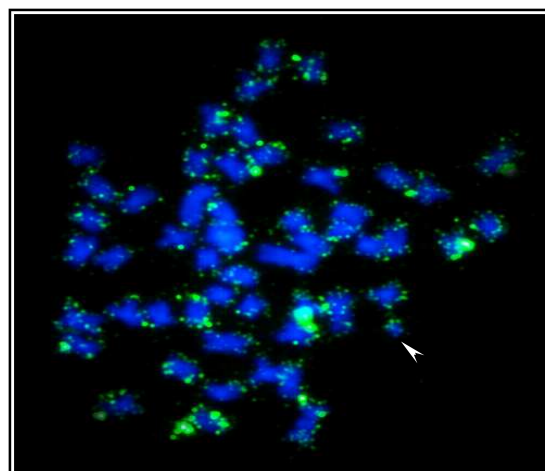


Figura 3. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda da família da histona H3 em metáfases de *P. lineatus* com frequências de um a nove cromossomos supranumerários. (setas indicam os cromossomos B em seus diferentes graus de homologia com a sonda).

Figura 4. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda da família gênica da histona H3 em metáfase de *P. nigricans* com um cromossomo supranumerário (seta indica o cromossomo B).



Utilizando a sonda da histona H4 observou-se um enorme *cluster* no braço curto do quarto par de cromossomo submetacêntrico do conjunto padrão A para *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans* (figura 5a, b). Esta família de histona mostrou-se conservada para estas duas espécies em estud. Porém, os seus respectivos cromossomos supranumerários não mostraram homologia com esta sonda.

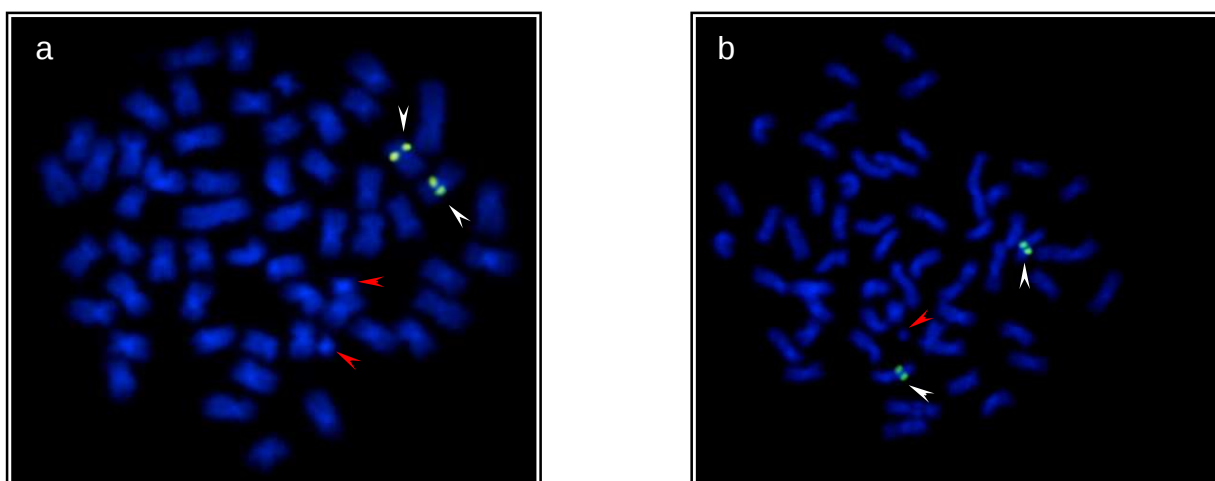


Figura 5. Padrão de distribuição da família gênica da histona H4 em **(a)** metáfase de *P. lineatus*; **(b)** metáfase de *P. nigricans*. Nenhum cromossomo B apresentou homologia com a sonda H4 (setas vermelhas).

DISCUSSÃO

Todos os *Prochilodus* analisados citogeneticamente neste presente trabalho exibiram características cromossômicas conservadas quanto ao número diploide de 54 cromossomos com morfologia cromossômica em conformidade com os dados disponíveis na literatura para estas espécies (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al. 1997; Venere et al. 1999, Dias et al., 1998; Maistro et al., 2000; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Oliveira et al., 2003; Artoni et al., 2006; Voltolin et al., 2009; capítulo 1). Além disso, foram encontrados cromossomos B com uma frequência de um a nove em *Prochilodus lineatus* conforme descrito por Voltolin et

al. (2011) e um único indivíduo de *Prochilodus nigricans* portador de um cromossomo B de acordo com dados descritos por Venere et al. (1999) e (capítulo 1).

O conhecimento sobre a origem e função dos elementos retrotransponíveis nos genomas de peixes é ainda bastante reduzido e fragmentado, principalmente quanto à estrutura e organização nos cromossomos dos representantes deste grupo biológico (Ferreira et al., 2011a).

Geralmente, os transposons apresentam uma organização suficientemente distinta entre as espécies se dispersando pelo genoma e ocupando, usualmente, regiões eucromáticas, conforme já observado em humanos e insetos (Vollf et al., 2003). Este padrão disperso também foi observado nas duas espécies de *Prochilodus* analisadas neste estudo com o elemento retrotransponível Rex1. Além disso, a dispersão dos elementos Rex também foram descritos para as espécies da subfamília Hypoptopomtinae, usando o Rex1 e Rex3 (Ferreira et al 2011b), em *Erythrinus erythrinus* com o Rex3 (Cioffi et al., 2010) e para os perciformes da Antártida usando os elementos Rex1 e Rex3 (Ozouf-Costaz et al 2004). Por outro lado, peixes derivados do grupo dos Tetraodontiformes (*T. nigroviridis*) apresentam um genoma extremamente compacto, a separação entre regiões ricas e pobres de segmentos gênicos é muito evidente (Fischer et al., 2004; da Silva et al., 2002) e aparentemente os elementos transponíveis se utilizam da heterocromatina como abrigo, pois nessas regiões a pressão de seleção é menor (Lippman, et al., 2004).

Além do padrão disperso do elemento Rex1 encontrado no genoma destes *Prochilodus*, vale a pena salientar que alguns pequenos *clusters* foram localizados em regiões heterocromáticas como nos centômeros de alguns pares cromossômicos e em algumas nas regiões teloméricas. Frequentemente, os elementos

retrotransponíveis Rex são encontrados espalhados por todo o genoma das espécies e mais intensamente nas regiões eucromáticas dos cromossomos. Entretanto, alguns blocos destes elementos transponíveis são coincidentes com regiões heterocromáticas, sugerindo que o padrão de distribuição destes retroelementos pode ser distinto em diferentes ordens de peixes (Ferreira et al. 2011a).

A natureza heterocromática dos cromossomos B pode ser derivada de elementos transponíveis por duas razões: São melhores tolerados em regiões genômicas de baixa densidade gênica, pois as inserções destes transposons são geralmente deletérias. Por fim, os elementos transponíveis podem mostrar uma tendência de ser um fácil alvo de heterocromatização (Dimitri et al., 1997).

O peixe *Alburnus alburnus* é caracterizada pela presença de um grande cromossomo supranumerário de tamanho comparável ao seu maior cromossomo autossômico. Análises com FISH mostraram que o retrotransposon Gypsy/Ty3 está localizado exclusivamente no cromossomo B desta espécie (Ziegler et al., 2003), e ausente nos cromossomos B de espécies relacionadas como *Rutilus rutilus*. Estes autores sugerem a ocorrência de um específico processo de dispersão deste elemento retrotransponível durante a evolução dos cromossomos supranumerários para este grupo de peixes. Os dados apresentados no presente trabalho não estão em concordância com os encontrados para *Alburnus alburnus*. Nas espécies de *Prochilodus* o elemento retrotransponível Rex1, localiza-se além do complemento A em todos os cromossomos supranumerário (figuras 1 e 2), mostrando um compartilhamento entre os elementos transponíveis do complemento padrão e seus respectivos supranumerários. Porém os diferentes graus de homologia encontrados nos cromossomos B em *P. lineatus* podem revelar algumas particularidades que

diferenciam os supranumerários até mesmo dentro do próprio genoma. Entretanto, tanto os cromossomos B quanto os autossômicos destes exemplares apresentaram homologia com a sonda diferentemente do observado em *A. alburnus* onde somente o cromossomo B foi evidenciado (Ziegler et al., 2003).

A localização cromossômica da histona H3 em *P. lineatus* e *P. nigricans* ambos portadores de B (figuras 3 e 4) revelou um padrão diferenciado distribuição em relação a dados na literatura concernentes à utilização desta família gênica. Frequentemente, esta é caracterizada em *tandem* conforme descrito para alguns insetos da família Proscopiidae (Cabral-de-Mello et al., 2011a); Scarabaeidae (Cabral-de-Mello et al., 2011b); em 35 espécies de gafanhotos Acrididae (Cabrero et al., 2009); uma espécie de bivalve da família Pectinidae (Zhang et al., 2007) dentre outros organismos. Desta forma, a histona H3 é considerada um excelente marcador cromossômico (Cabrero et al., 2009). Em *Prochilodus*, no entanto, observou-se um padrão disperso de distribuição ao longo do genoma e na maioria dos supranumerários em suas diferentes frequências, conforme já descrito por Oliveira et al. (2011) em gafanhotos *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae). Estes autores associaram a dispersão da histona H3 pelo genoma desta referida espécie ao gene 5S reforçando a ideia de co-dispersão/co-localização destas duas famílias gênicas.

Com base nesta teoria, poderíamos associar o padrão de dispersão da histona H3, observado nos genoma dos *Prochilodus*, ao gene retrotransposons Rex 1 o qual também se encontrou disperso conforme observado neste trabalho . Porém, no intuito de comprovar esta hipótese torna-se imprescindível a utilização destas duas sondas por meio de dupla FISH, conforme realizado por Oliveira et al. (2011)

no entendimento desta suposta co-dispersão/co-localização no genoma de *R. brasiliensis*

As diferenças de homologia encontradas pela sonda H3 nas mais variadas frequências de cromossomos B em *Prochilodus lineatus* (figura 3a, b, c, d, e, f, g, h, i) comprovaram uma identidade particular para cada supranumerário presente neste mesmo genoma. Além disso, é importante ressaltar que um número reduzido de B não apresentou homologia com a histona H3, evidenciando ainda mais a particularidade encontrada entre os supranumerários também observada com o emprego da sonda Rex1. Camacho, 2005 considera que os cromossomos B incluem uma variedade de cromossomos extras que exibem heterogeneidade quanto a sua natureza, comportamento e dinâmica evolutiva e devem ser considerados como um elemento único. Em *P. nigricans* também foi observado um padrão disperso de H3 em um único cromossomo B (figura 4). Entretanto, não foi possível estabelecer análises comparativas quanto ao padrão de distribuição da histona H3 neste genoma porque somente um cromossomo B foi evidenciado.

Alguns estudos de mapeamentos cromossômicos têm sido realizados com as histonas, principalmente a H3 e H4, na busca de indícios sobre a origem dos supranumerários. Teruel et al. (2010) encontraram uma associação da histona H3 e H4 entre o par cromossômico oito e os supranumerários em *Locusta migratoria* reforçando ainda mais a hipótese de origem intra-específica dos B para esta espécie. Este é um dos raros resultados que permitiram associar a origem dos cromossomos B a partir das histonas. Neste estudo, entretanto, a histona H4 não foi observada nos supranumerários de ambas as espécies (figura 5). Deste modo, não podemos associar este gene a origem dos supranumerários em *Prochilodus*, ao contrário do observado por Teruel et al. (2010) em *L. migratória*.

Neste trabalho observamos a presença da histona H3 e do elemento retrotransponível Rex1 na maioria dos cromossomos B analisados (figuras 1, 2, 3 e 4). Entretanto, a dispersão destes genes tanto nos cromossomos padrão A quanto nos supranumerários dificulta as análises sobre a exata origem destes elementos extras nos genomas destas duas espécies portadoras. Esta mesma dificuldade em identificar qual ou quais pares cromossômicos originaram os cromossomos B nos indivíduos portadores também foi relatada por Oliveira et al (2011) em *Rhammatocerus brasiliensis*. Estes autores detectaram a presença de sequência de DNAr 5S associada a histona H3 espalhada por todo o genoma deste inseto, inclusive em seu cromossomo X. Diante disso, concluíram que os genes 5S e H3 não são considerados bons marcadores no estudo da origem dos B em *R. brasiliensis*. Esta observação é condizente com o presente resultado, pois, o padrão disperso da histona H3 e Rex1 encontrada em *Prochilodus* e também nos supranumerários dos indivíduos portadores dificulta a compreensão sobre sua exata origem nestas duas espécies.

A ausência de recombinação dos cromossomos B relatada em muitas espécies portadoras durante a meiose assumindo uma conformação univalente pode facilitar a acumulação de DNA repetitivo (Szauter, 1984; Camacho, 2005). Desta forma, os supranumerários são considerados uma espécie de “depósito” de sequências de DNA repetitivo, DNA ribossômico, transposons e outros elementos genômicos (Camacho et al., 2000; Camacho 2005). Esta acumulação de sequências repetitivas parece ser um caminho bastante comum na diferenciação dos cromossomos B conforme observado neste estudo, pois todos os cromossomos B analisados exibiram um padrão diferenciado de distribuição dos retroelementos Rex1 e a grande maioria apresentou marcações correspondentes à histona H3. A

evolução *de novo* de DNA repetitivo em cromossomo B a partir de sequências eucromáticas (Langdon et al., 2000) pode sugerir um possível caminho evolutivo para a diferenciação molecular dos supranumerários em relação aos seus ancestrais autossômicos (Camacho, 2005).

Como se pode observar, todos os cromossomos B de *P. lineatus* e *P. nigricans* estão repletos de elementos transponíveis ao longo de seu genoma conforme observado para Rex1. A presença destes elementos saltatórios influencia nas trocas gênicas entre cromossomos A e B. Neste estudo levantamos uma hipótese sobre uma suposta associação entre histona H3 e Rex1 no genoma de *Prochilodus*, porém, existem inúmeras outras possibilidades de estes elementos retrotransponíveis atuarem como vetores na transposição outros genes entre os cromossomos A e B. Isto pode influenciar conclusões errôneas sobre o surgimento dos supranumerários a partir de genes de comum ocorrência entre os supranumerários e seu complemento padrão, nas hipóteses de origem intra-específica.

CAPÍTULO 4

Origem dos Cromossomos B em *Prochilodus* obtida
por pintura cromossômica associada à FISH
simples e cruzada

RESUMO

Este trabalho realizou correlações entre as sequências específicas de cromossomos B com o complemento autossômico de cinco diferentes espécies de *Prochilodus* portadoras e não-portadoras de supranumerários, por meio da microdissecção cromossômica associada à técnica de FISH. Para a realização das análises foram utilizados exemplares de *Prochilodus argenteus*; *Prochilodus brevis*; *Prochilodus costatus*; *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*. A Hibridação *in situ* Fluorescente simples com a sonda específica de cromossomo B de *P. lineatus* em preparações da mesma espécie revelou marcações nos cromossomos B, nenhum cromossomo do complemento A apresentou homologia com esta sonda. Este mesmo resultado foi observado ao utilizarmos a sonda de cromossomo B de *P. nigricans* em preparações desta mesma espécie. No entanto, a Hibridação *in situ* cruzada; com sonda específica de cromossomo B de *P. lineatus* hibridada em preparações de *P. nigricans* e a sonda específica de cromossomo B de *P. nigricans* hibridada em preparações de *P. lineatus*; demonstraram marcações nos cromossomos B, porém em graus diferenciados de homologia; em nenhum caso foi observado marcações nos cromossomos autossômicos. Ao utilizarmos estas sondas específicas de supranumerários em preparações cromossômicas de *P. argenteus*, *P. brevis* e *P. costatus* ambas não-portadoras de supranumerários não se observou sinais de homologia com os cromossomos A. Detecção de sequências específicas de heterocromatina ao longo das cromátides dos B seja por meio de hibridação simples ou cruzada sugere uma suposta origem interespecífica. No entanto, não se pode descartar a hipótese da origem intra-específica, onde, os cromossomos B podem ter surgido a partir do complemento A, porém por apresentarem DNA altamente repetitivo e susceptível a mutações, tornaram-se diferenciado dos cromossomos ancestrais.

INTRODUÇÃO

O termo “Cromossomo B” inclui uma variedade de cromossomos extras que exibem heterogeneidade conspícua com natureza, comportamento e dinâmica evolutiva própria. Por esta razão, não é fácil buscar uma definição coerente quanto a estes elementos extras (Camacho, 2005). Camacho e Parker, (1994) durante a primeira Conferência de Cromossomo B definiram que os supranumerários seriam cromossomos adicionais, dispensáveis os quais estão presentes em alguns indivíduos de determinadas espécies e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, porém não seguindo seu caminho evolutivo. Esta definição revelou algumas das mais importantes propriedades universais destes cromossomos: são elementos dispensáveis (eles não são necessários para o ciclo de vida normal do genoma hospedeiro); sua origem é a partir dos cromossomos do complemento padrão (A) (originário da mesma espécie ou de espécie diferente); não se recombina com cromossomos do conjunto padrão (A).

Não há uma elucidação definitiva quanto à origem dos cromossomos B. Há, no entanto, muitas hipóteses que tentam explicar os diversos caminhos que os supranumerários podem ter sido originados (Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Berdnikov et al., 2003; Jones e Houben, 2003). É muito provável que tiveram diversas origens nos distintos organismos portadores.

Existem muitas teorias relacionadas ao surgimento dos cromossomos B. Duas hipóteses gerais têm sido propostas. Na primeira, de origem intra-específica (Jamilena et al., 1994, 1995; Houben et al., 1996; Peppers et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Camacho et al., 2000; Camacho 2005), os cromossomos B surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. Na

segunda hipótese, da origem interespecífica (Sapre e Deshpande, 1987; Eickbush et al., 1992; McVean, 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001) os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização.

Na década de 90 técnicas revolucionárias envolvendo a microdissecção de cromossomos específicos e amplificações de diversas sequências de DNA por meio da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) seguidas de clonagem e marcações para serem utilizadas em Hibridação *in situ* Fluorescente tornaram-se ferramentas imprescindíveis no estudo da origem dos supranumerários nos diversos organismos portadores (Camacho, 2005).

Pouco é conhecido sobre a composição molecular do DNA presente especificamente nos cromossomos supranumerários de peixes (Jesus et al., 2003). O desenvolvimento de sondas utilizando a microdissecção cromossômica tem sido descrita como um procedimento adequado na comparação entre grupos de peixes e este método tem revelado sucesso em estudos relacionados à homologia cromossômica em *Eigenmannia* (Henning et al. 2008), cromossomos sexuais em *Triportheus* (Diniz et al. 2008), peixes Cyprinid (Ráb et al. 2008) e cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* (Voltolin et al., 2010c).

Devido a este avanço concernente as análises quanto à origem dos cromossomos B em peixes, especificamente em *P. lineatus*, o propósito do presente estudo foi a construção das sondas específicas de cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus* oriundos do rio Mogi Guaçu e de *Prochilodus nigricans* provenientes do rio Araguaia (TO) por meio da técnica de microdissecção cromossômica e, a posterior utilização destas duas sondas específicas e também da sonda de B de *P. lineatus* já desenvolvida e publicada por Voltolin et al. 2010c em

diferentes frequências de supranumerários de *P. lineatus* e *P. nigricans*. Ainda neste estudo da origem dos microcromossomos utilizou-se destas sondas em outras espécies do gênero *Prochilodus* não-portadoras de supranumerários, *Prochilodus argenteus* (rio São Francisco, MG), *Prochilodus brevis* (DNOCs, RN) e *Prochilodus costatus* (piscicultura AQUICULTURA TROPICAL) por meio da utilização da Hibridação *in situ* Fluorescente simples e cruzada no intuito de buscar indícios sobre o surgimento dos microcromossomos neste gênero. A origem, organização molecular, evolução e análise comparativa das sequências específicas de cromossomos B entre algumas espécies que compõe o gênero *Prochilodus* portadoras ou não-portadoras de supranumerários são discutidas neste presente estudo.

MATERIAIS e MÉTODOS

Local de coleta e análises citogenéticas

Foram utilizados 50 exemplares de *P. lineatus* (Valenciennes, 1847) com diferentes frequências de cromossomos B coletados na população natural do rio Mogi-Guaçu, SP, Brasil. Além disso, também foram utilizadas espécimes de *P. lineatus* obtidas por meio de cruzamentos induzidos realizados no CEPTA/ICMBio (Pirassununga, SP, Brasil).

17 exemplares de *P. nigricans* (Spix e Agassiz, 1829) provenientes do rio Araguaia (TO), bacia Tocantins-Araguaia, Brasil. Ainda no estudo da origem dos cromossomos B no gênero *Prochilodus* foram adquiridos na piscicultura AQUICULTURA TROPICAL, município de Propriá, SE, Brasil 30 exemplares de *P. costatus* (= *P. affinis* Valenciennes, 1850); seis indivíduos *P. argenteus* (Agassiz,

1829) proveniente do rio São Francisco (MG), Brasil e, por fim, cinco exemplares de *P. brevis* (Steindachner, 1875) coletados na represa DNOCs (RN), Brasil.

O método de estimulação mitótica foi utilizado para análise citogenética, por meio da técnica de injeção de solução de fermento no indivíduo induzindo a mitose conforme descrito por Cole e Leavens (1971) e adaptada para peixes por Oliveira et al. (1988), posteriormente foram obtidas as suspensões diretas de células renais de acordo com o método utilizado por Foresti et al. (1981).

Preparações cromossômicas dos indivíduos portadores de cromossomos B (*P. lineatus* e *P. nigricans*) após a fixação com Carnoy foram ressuspensas em metanol puro e posteriormente, estocadas a 4° para a realização da microdissecção cromossômica.

Microdissecção cromossômica e amplificação por DOP-PCR

A microdissecção cromossômica foi realizada de acordo com o método descrito por Ludecke et al. (1989) e Zhou e Hu (2007). A suspensão celular mantida em metanol em refrigeração foi centrifugada e ressuspensa em fixador Carnoy gelado. Para a realização da microdissecção as células foram pingadas diretamente em lamínulas (24mm x 50mm) e, subsequentemente, coradas com Giemsa (5%) por 8 minutos. Cromossomos B foram identificados por meio de microscópio invertido (IM-35, Carl Zeiss, Germany) e dissecados em um micromanipulador (5171-Eppendorf, USA) utilizando agulhas siliconizadas com diâmetro de 10-70 µm. Aproximadamente 5 a 10 cromossomos supranumerários foram retirados de diferentes metáfases de um único indivíduo portador e transferidos por meio da quebra da ponta da agulha para um tubo de Eppendorff contendo os seguintes

reagentes: 10nM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 7.5 - 8.0; 0.1% SDS; 0.1% Triton X100; 500 µM proteinase K e 30% glycerol.

Alíquotas (3µl) dos reagentes acima citados contendo os supranumerários microdissectados foram transferidas para tubos de PCR contendo 0.5µl de uma mistura que consistiu em 14.5µl de H₂O; 2µl 10X buffer para termosequenase (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit-USB); 4 µl dNTP (2.5mM cada) e 2µl de *primer* DOP (5`-CCGACTCGAGNNNNNATGTTGG-3`). O DNA microdissectado foi amplificado por DOP-PCR (Telenius et al. 1992).

Tubos contendo esta mistura foram aquecidos a 90° por 10 minutos e brevemente centrifugados. Após a desnaturação inicial 2.5µl 4U/µl de Termosequenase foi adicionada ao tubo de PCR o qual foi colocado em um termociclador (Termocycler Mater Cycle Gradiente (Eppendorf, USA) nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 12 ciclos de 94°C por 90 segundos; 37° por 2 minutos; 37° por 1 segundo (0.2°C/s até alcançar 72°C); 72°C por 2 minutos, seguindo 30 ciclos de 94°C por 90 segundos; 62°C por 1 minuto e por fim 72°C por 90 segundos. Após a DOP-PCR convencional foi realizada uma outra reação de amplificação contendo: 33.5µl de H₂O; 5µl 10X buffer, 4µl MgCl₂; 2µl de dNTP (2.5mM cada); 3µl 100µM de *primer* DOP; 0.5µl 5U/µl Taq Polymerase (Thermus Aquaticus DNA polymerase) e 2 µl do produto da DOP-PCR, nas seguintes condições: 90°C por 3 minutos; 30 ciclos de 90°C por 90 segundos; 56°C por 90 segundos; 72°C por 90 segundos.

Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

As sondas específicas de cromossomos supranumerários das duas espécies de *Prochilodus* portadoras foram marcadas com incorporação de dUTP (digoxigenina-rodamina). A Hibridação *in situ* Fluorescente foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986). Desnaturou-se o DNA cromossômico por imersão da lâmina em formamida 70%/2XSSC (pH7.0) a 70°C por 5 minutos e posteriormente, desidratou-as em séries alcoólicas (70%, 80% e 100%). O DNA foi hibridado a 37°C em câmara úmida *overnight* utilizando 1µg de sonda desnaturada dissolvida em formamida 50%, 10mg/ml de sulfato de dextrano; 2XSSC e 5mg/ml de DNA de esperma de salmão para a supressão de sinais não específicos. As preparações cromossômicas foram contracoradas e montadas com Vectashield antifade/DAPI (4', 6'- diamidino-2-phenylindole) Vector. As metáfases foram analisadas sob o fotomicroscópio de fluorescência (BX61, Olympus) equipado com câmera digital refrigerada (BX 61, Olympus) e fotomicrografadas utilizando o software Pro MC 6.0.

RESULTADOS

Em todos os exemplares analisados citogeneticamente foi detectado um número diplóide de 54 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico considerada uma característica comum entre todos os indivíduos destas espécies descritas acima (capítulo 1). No entanto, somente *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans* apresentaram cromossomos supranumerários em seu conjunto cariotípico, onde *P. lineatus* mostrou-se com uma frequência de um a nove B (anexo 1) e *P. nigricans* com apenas um cromossomo supranumerário (capítulo 1).

Para obtenção das sondas cromossômicas por microdissecção, primeiramente foi selecionado um indivíduo de cada espécie portadora (*P. lineatus* e *P. nigricans*) com apenas um supranumerário em seu conjunto cariotípico para posterior aplicação da Hibridação *in situ*. Além disso, utilizamos da sonda específica de cromossomo B de *P. lineatus* construída e publicada anteriormente por Voltolin et al. (2010c).

Após a construção das sondas específicas de cromossomos supranumerários de *P. lineatus* e *P. nigricans* as denominamos de sonda **BPL** (para a sonda específica de cromossomo B de *P. lineatus*, obtida neste trabalho como para a já publicada por Voltolin et al. (2010c), pois ambas demonstraram o mesmo resultado) e sonda **BPN** (para a sonda específica de cromossomo B de *P. nigricans*). Munidos destas sondas realizamos a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) simples e cruzada em exemplares do gênero *Prochilodus* estudados.

Os resultados da Hibridação *in situ* Fluorescente com a sonda **BPL** em exemplares de *P. lineatus* com frequência de zero a nove cromossomos B revelaram homologia apenas com o material genético que compõe as cromátides dos elementos supranumerários, não foi detectada qualquer associação desta sonda com os cromossomos do complemento padrão A (figura 1).

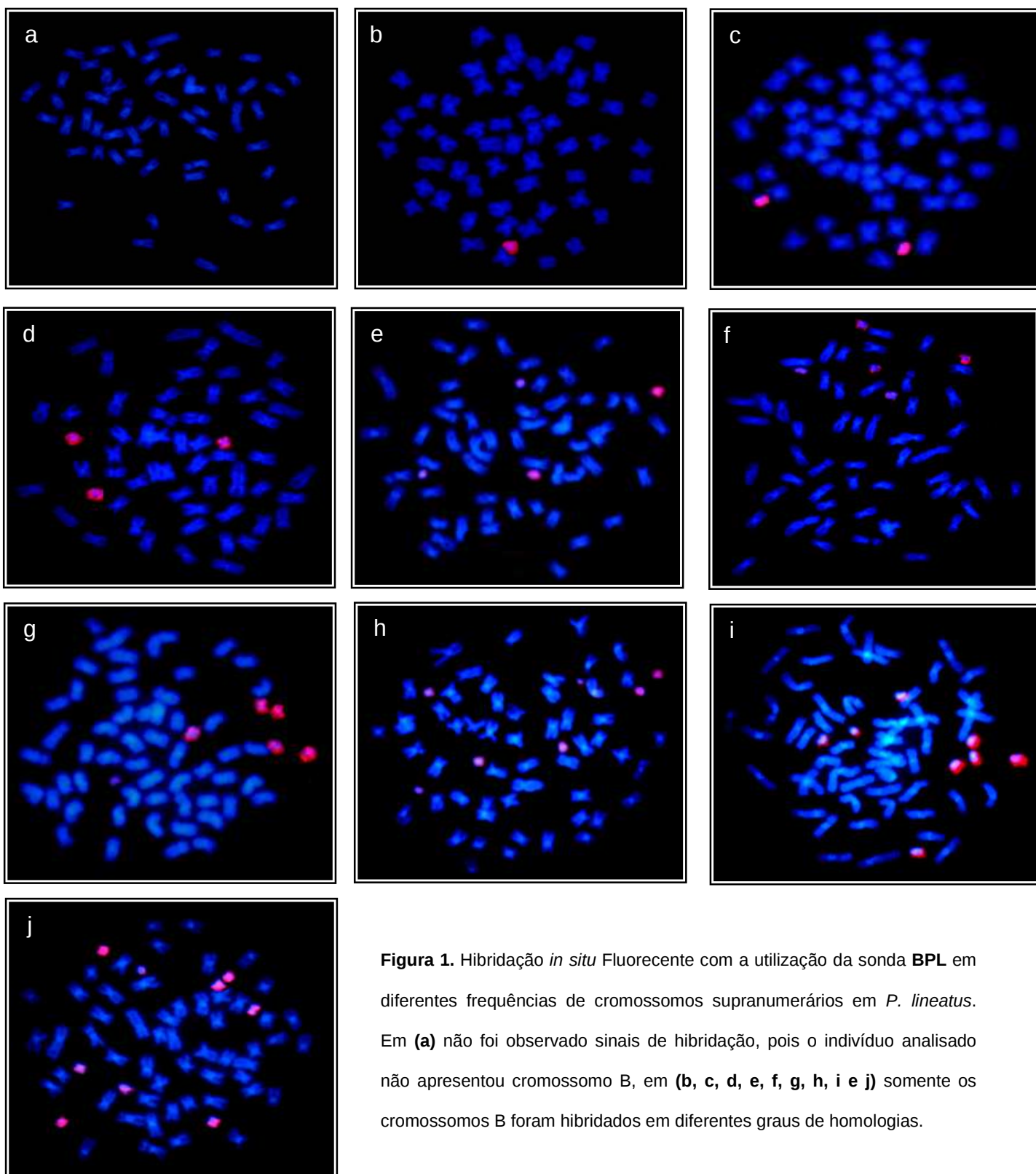


Figura 1. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda **BPL** em diferentes frequências de cromossomos supranumerários em *P. lineatus*. Em **(a)** não foi observado sinais de hibridação, pois o indivíduo analisado não apresentou cromossomo B, em **(b, c, d, e, f, g, h, i e j)** somente os cromossomos B foram hibridados em diferentes graus de homologias.

Utilizando a sonda **BPN** em FISH cruzada nestes mesmos exemplares de *P. lineatus*, também foi observada homologia somente com os supranumerários, não foi

detectada qualquer associação desta sonda com os cromossomos do conjunto A (figura 2).

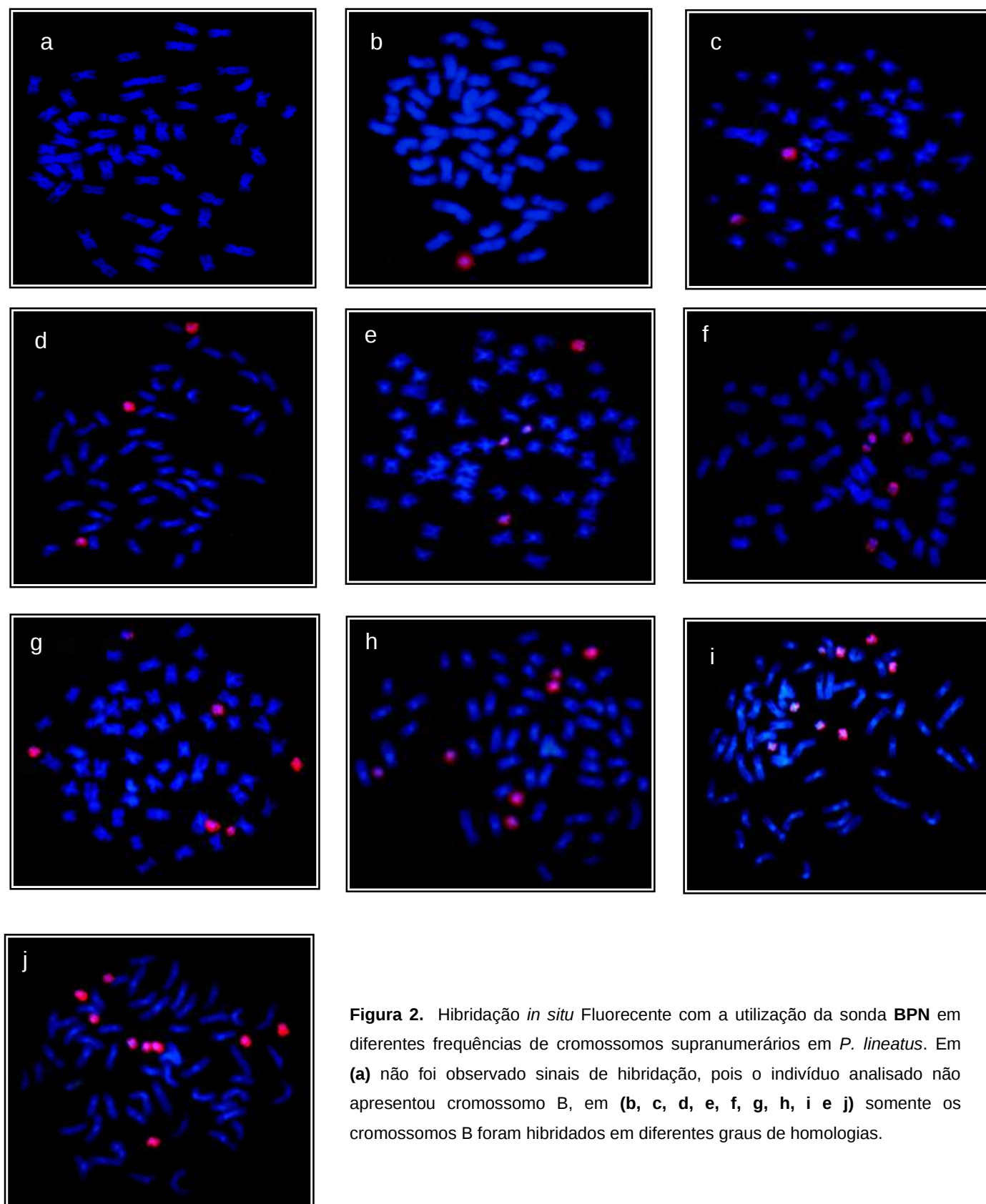


Figura 2. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda **BPN** em diferentes frequências de cromossomos supranumerários em *P. lineatus*. Em (a) não foi observado sinais de hibridação, pois o indivíduo analisado não apresentou cromossomo B, em (b, c, d, e, f, g, h, i e j) somente os cromossomos B foram hibridados em diferentes graus de homologias.

Os resultados apresentados mostraram diferentes graus de homologias das sondas **BPL** e **BPN** em indivíduos com mais de dois cromossomos B. Em alguns casos pode-se verificar que alguns B encontravam-se totalmente hibridados enquanto outros exibiam homologias parciais em distintas regiões cromossômicas.

O emprego da técnica de FISH utilizando-se a sonda **BPN** em exemplares de *Prochilodus nigricans* revelou resultados semelhantes ao encontrado em *Prochilodus lineatus*, ou seja, a homologia somente foi encontrada nas cromátides dos cromossomos B, nenhum cromossomo do complemento A foi hibridado (figura 3).

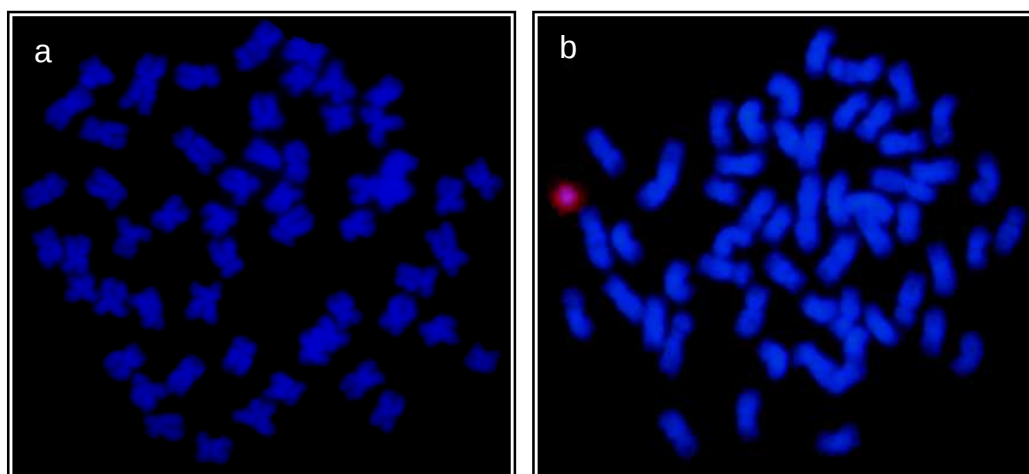


Figura 3. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda **BPN** em cromossomo supranumerário de *P. nigricans*. Em (a) não foi observado sinais de hibridação, pois o indivíduo analisado não apresentou cromossomo B, em (b) a sonda apresentou homologia apenas com o supranumerário.

A sonda **BPL** também foi utilizada na Hibridação *in situ* Fluorescente cruzada em exemplares de *P. nigricans* com frequência de zero a um cromossomo B. Os resultados foram semelhantes aos já descritos anteriormente, ou seja, não se observou qualquer associação desta sequência de DNA com as dos cromossomos autossômicos. No entanto, esta sonda apresentou uma pequena homologia com as cromátides dos cromossomos B onde se pode observar marcações, porém nem todo o cromossomo B foi totalmente hibridado (figura 4).

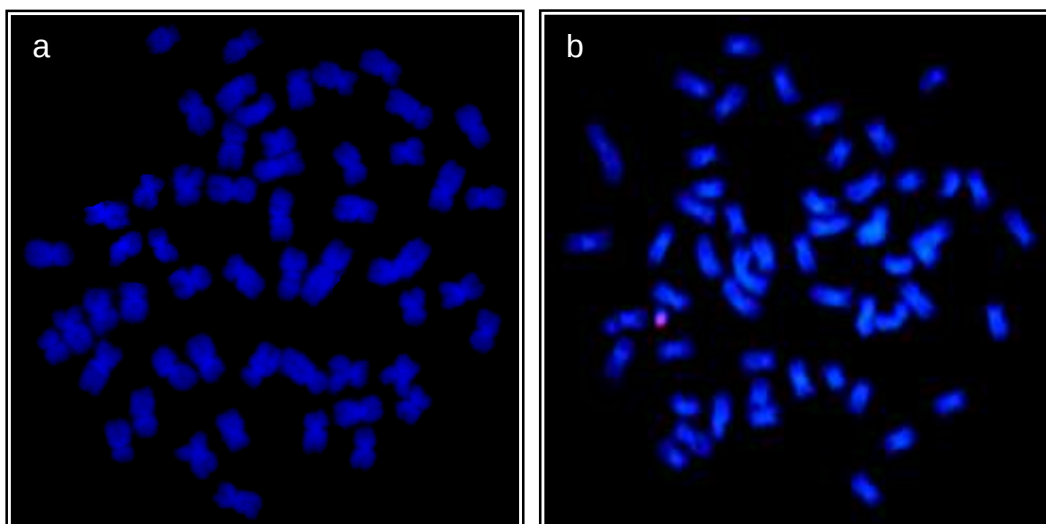


Figura 4. Hibridação *in situ* Fluorescente com a utilização da sonda **BPL** em cromossomo supranumerários em *P. nigricans*. Em (a) não foi observado sinais de hibridação, pois o indivíduo analisado não apresentou cromossomo B, em (b) a sonda apresentou homologia em uma pequena região do cromossomo supranumerário.

O emprego da técnica de FISH utilizando-se as sondas específicas de cromossomos B (sonda **BPL** e sonda **BPN**) em exemplares de *P. argenteus* (figuras 5a e 6a), *P. brevis* (figuras 5b e 6b) e *P. costatus* (figuras 5c e 6c) revelaram uma não-homologia das sequências de B com os cromossomos do complemento padrão A, pois se trata de espécies não-portadoras de supranumerários.

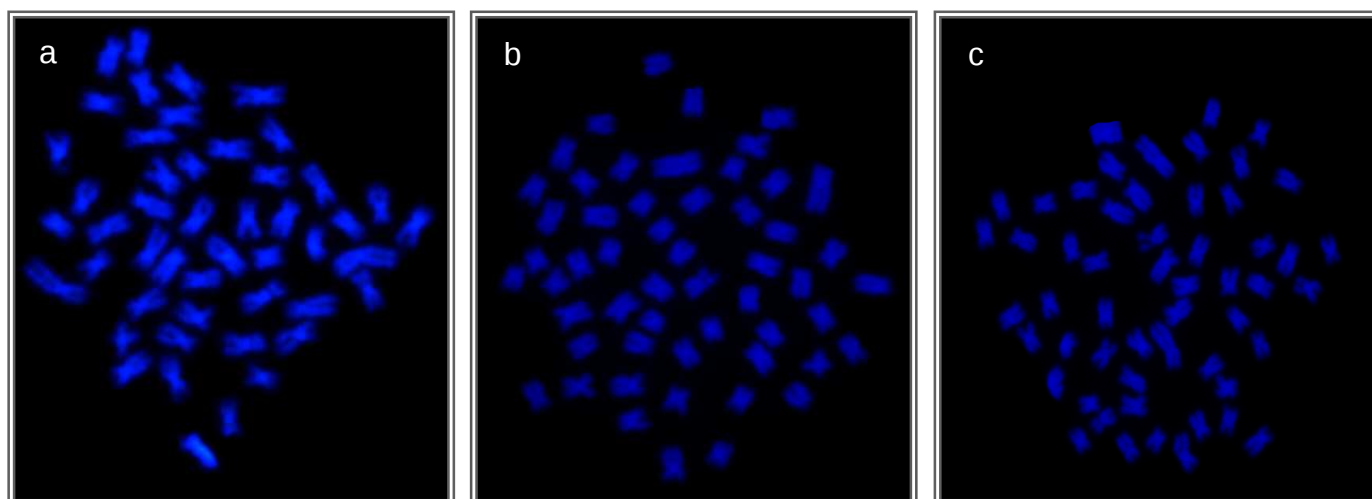


Figura 5. Utilização da sonda **BPL** em metáfases de *P. argenteus* (a), *P. brevis* (b) e *P. costatus* (c) onde não se observou sinais de homologia com a sonda.

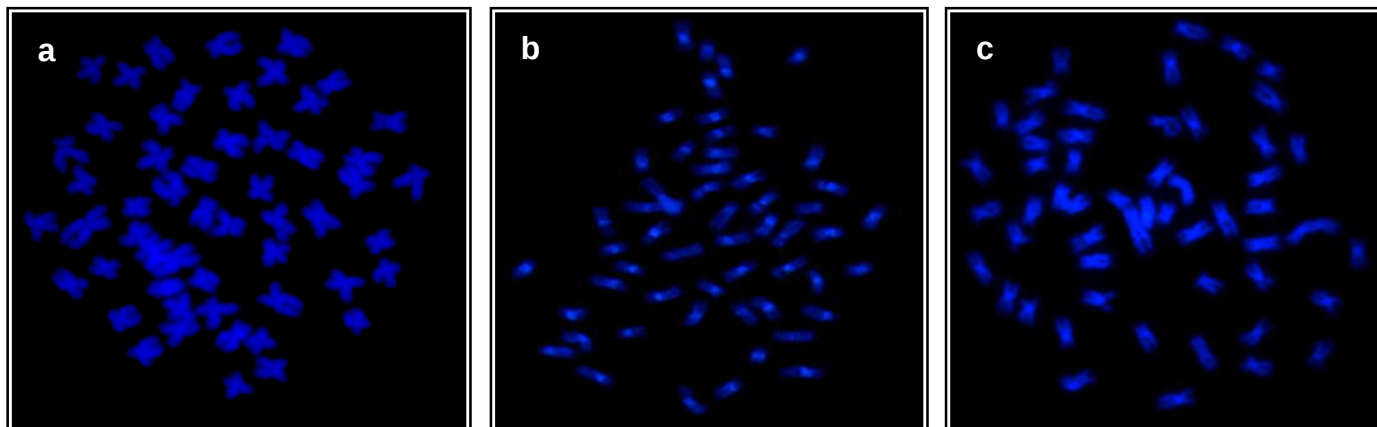


Figura 6. Utilização da sonda **BPN** em metáfases de *P. argenteus* (a), *P. brevis* (b) e *P. costatus* (c) onde não se observou sinais de homologia com a sonda.

DISCUSSÃO

Neste presente trabalho, a utilização das sondas **BPL** e **BPN** em Hibridação *in situ* Fluorescente simples e cruzada em *P. lineatus* e *P. nigricans*, ambos portadores de cromossomos B, indicaram ausência de similaridade das sequências presentes nas cromátides dos cromossomos B em relação as do complemento A, onde não se detectou sinais destas sondas (figuras 1, 2, 3 e 4). Diante destes resultados torna-se possível levantar duas hipóteses que supostamente explicariam a origem dos supranumerários nestas duas espécies. A primeira atribui a uma origem independente do complemento autossômico por processos de hibridizações entre as espécies deste gênero. A segunda incita uma origem intra-específica onde os cromossomos B poderiam ter surgido a partir do complemento A, porém por apresentarem um DNA altamente repetitivo e susceptível a mutações ao longo dos anos, estas sequências tornaram-se totalmente diferenciada dos cromossomos ancestrais A os quais os originaram.

A maioria das hipóteses sobre a origem dos cromossomos B aponta uma derivação a partir dos cromossomos A como um simples produto da evolução cariotípica (Camacho, 2005).

Muitas teorias têm sido propostas para decifrar o surgimento dos cromossomos B nos organismos portadores. Dentre elas podem-se destacar algumas como a Aneuploidia, existência de cromossomos A incompletos (em particular, a presença de cópias extras de certos cromossomos) é uma das principais especulações dos cromossomos B potenciais. Notavelmente, os cromossomos extras A (polissômicos) são usualmente heterocromatizados e adquirem aparência e comportamento meiótico semelhante a muitos cromossomos B (Hewit, 1973; Peters, 1981; Talavera et al., 1990). “Novos B” podem também serem produtos de mutações cromossômicas como translocação Robertsoniana, surgindo como um pequeno fragmento durante a fusão de dois acrocêntricos A formando um metacêntrico. Em outros casos a origem dos cromossomos B pode estar associada a uma região específica do cromossomo A. Na aneuploidia o “novo cromossomo B” pode também se derivar expelindo completamente os cromossomos A do espermatozoide em pseudogametas paternogênicos conforme observado em *Polycelis nigra* (Sharbel et al., 1997) ou por escape e destruição do espermatozoide por meio de incompatibilidade seguido pela hibridização conforme observado entre as vespas *Nasonia vitripennis* e a *Trichomalopsis* (McAllister e Werren, 1997; Perfectti e Werren, 2001).

Variáveis da teoria intra-específica obtiveram um enorme embasamento nos estudos de cromossomos B em peixes. Mestriner et al. (2000); Néo et al. (2000); Jesus et al. (2003); Artoni et al. (2006) sugeriram a origem dos cromossomos B por isocromossomos. Mestriner et al. (2000); Néo et al. (2000) ao estudarem a espécie

Astyanax scabripinnis detectaram por meio de bandamento C a presença de sequências repetidas em ambos os braços do cromossomo B, de modo semelhante ao par 24 do conjunto cromossômico A, mostrando, desta forma, argumentos favoráveis da origem dos cromossomos B em processo de formação de um isocromossomo. Recentemente, Vicari et al. (2011) estudaram a origem do cromossomo B em *Astyanax scabripinnis* a partir da utilização de sonda específica de cromossomo B, As51, 18S e 5S. Estes autores comprovaram a origem intra-específica do B para esta espécie, entretanto, a precisa origem do B a partir dos cromossomos autossômicos não foi elucidada. Por fim, Voltolin et al. (2010c) isolaram o cromossomo B de *P. lineatus* por meio da técnica de microdissecção e após a realização da Hibridação *in situ* Fluorescente observaram que somente os cromossomos B desta referida espécie apresentaram homologia com a sonda. Portanto, a teoria de origem intra-específica por formação de isocromossomo dos supranumerários em *P. lineatus* proposta por Jesus et al. (2003) tornou-se questionável. Os dados deste trabalho utilizando as espécies *P. lineatus* e *P. nigricans* ambas portadoras de B confirmam os resultados obtidos por Voltolin et al. (2010c), ou seja, os B em *Prochilodus* são constituídos por sequências de DNA diferentes das do conjunto padrão A, o qual poderia estar relacionado a uma suposta origem interespecífica para os supranumerários neste gênero.

A utilização das sondas específicas de cromossomos supranumerários microdissectadas provenientes de exemplares de *P. lineatus* e *P. nigricans* também foram utilizadas em preparações cromossômicas de três espécies de *Prochilodus* não-portadoras de B (*P. argenteus*, *P. brevis* e *P. costatus*). Após a realização de técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) não se constatou sinal algum das sequências dos supranumerários no conjunto padrão A destas espécies (figuras 5 e

6). O intuito de utilizar as sondas **BPL** e **BPN** em indivíduos não-portadores de B foi buscar algum suposto indício das sequências específicas de supranumerários em algum cromossomo do complemento A, pois neste estudo buscou-se avaliar todas as possíveis possibilidades de origem dos B no gênero *Prochilodus*

Diante destes resultados, pode-se constatar que os cromossomos B presente em algumas espécies deste gênero parece não compartilhar sequências comuns com o complemento normal A de nenhuma espécie de *Prochilodus* estudada até o presente momento. Entretanto, a hipótese de que estes elementos já compartilharam sequências comuns com o conjunto A anos atrás e, hoje, após sofrerem grandes mutações não se observa mais tal compartilhamento, não pode ser descartada. Pode-se também questionar, que os elementos supranumerários presente neste gênero tenha se originado de maneira independente em cada espécie portadora e, conseqüentemente, evoluído por caminhos distintos.

Um aspecto intrigante dos cromossomos B é a obscura definição do seu significado genético em termos de origem, função, propriedades adaptativas e implicações evolutivas para os indivíduos portadores (Bougourd e Jones, 1997). Atualmente, a microdissecção tem sido extensivamente utilizada em estudos envolvendo cromossomos supranumerários. Teruel et al. (2009a) ao estudarem os cromossomos B e X em *Locusta migratoria* por meio da microdissecção demonstraram que o cromossomo B compartilhava dois tipos de sequências repetitivas com os cromossomos do conjunto padrão A, sugerindo que o B desta espécie apresentava uma origem intra-específica. Uma das sequências repetitivas estava localizada na porção distal do cromossomo B e na região pericentromérica do cromossomo A incluindo o X. Outro tipo de DNA repetitivo localizava-se acima, na

região eucromática de todos os cromossomos (A) e na porção eucromática proximal do cromossomo B.

Em outro estudo de origem dos cromossomos B realizado por Teruel et al. (2009b) em *Eyprepocnemis plorans* encontraram resultados semelhantes ao trabalho descrito anteriormente. Foram microdissectados os cromossomos X e B24. Após o emprego da técnica de FISH observou-se que estes cromossomos compartilhavam algumas sequências repetitivas, especificamente o DNAr 45S e DNA repetitivos em tandem de 180 pb, o qual se mostrou mais frequente no braço longo do cromossomo B24. Tais resultados sugerem a existência de sequências de DNA presentes no cromossomo B24 que também são compartilhadas com o cromossomo X. Além disso, é possível que outras sequências de DNA sejam compartilhadas entre os cromossomos B e X. Isto suporta a hipótese de que os cromossomos B nesta espécie derivaram-se do cromossomo X.

Com os resultados obtidos até o presente momento podemos considerar a hipótese de origem intra-específica por não-disjunção cromossômica (Jamilena et al., 1994, 1995; Houben et al., 1996; Camacho et al., 2000) para as espécies portadoras de supranumerários utilizadas neste estudo (*P. lineatus* e *P. nigricans*). A ocorrência de diferença entre a composição do DNA dos cromossomos A e B poderia ser decorrente do fato de que após sua origem por não-disjunção cromossômica, o segmento originário do cromossomo B teria seguido um caminho evolutivo independente acumulando profundas modificações nas sequências de seu DNA o que o diferenciaria do segmento cromossômico original. Entretanto a hipótese da origem interespecífica proposta por Sapre e Deshpande (1987); Eickbush et al., (1992); McVean (1995); Camacho et al. (2000); Perfectti e Werren (2001); Voltolin et al. (2010c) não pode ser descartada. Ainda estudos sobre a

origem dos cromossomos supranumerários neste gênero por hibridização interespecífica devem partir da descoberta do ancestral destas espécies o que requer um trabalho meticoloso a nível filogenético.

Conforme observado nas figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 o emprego das sondas **BPL** e **BPN** em preparações cromossômicas de *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. nigricans* não revelaram homologias com sequências de DNA do conjunto autossômico. No entanto, a Hibridação *in situ* Fluorescente cruzada demonstrou homologia entre os cromossomos supranumerários das duas espécies portadoras (figuras 2, 3, 4 e 5). Isto levanta especulações sobre uma suposta origem comum destes microcromossomos no gênero *Prochilodus*.

A ausência de homologia entre os cromossomos B e seus respectivos autossômicos revelada pelas sondas **BPL** e **BPN** e as pequenas diferenças quanto ao grau de homologia da hibridação, têm sido observadas entre os elementos extras do próprio indivíduo em relação às sondas utilizadas. Este dado nos leva a supor a existência de diferenças nas sequências de DNA que compõe os cromossomos B em um mesmo animal. Isto poderia, supostamente, ser atribuído a mutações que estes microcromossomos vêm sofrendo, individualmente, ao longo dos anos, os tornando cada vez mais diferenciados a nível molecular dos cromossomos A.

A acumulação de sequências repetitivas de DNA parece ser o caminho mais comum na diferenciação dos cromossomos B e a presença de DNAr em supranumerários de muitas espécies pode ser indicativo de uma possível função deste tipo de DNA na origem dos B. A evolução “de novo” do DNA satélite em sequências eucromáticas dos cromossomos B pode elucidar um possível caminho evolutivo pelo qual os cromossomos B se diferenciam molecularmente do

cromossomo A ancestral. Isto é ainda uma importante questão que aguarda uma resolução experimental (Camacho, 2005).

CAPÍTULO 5

Ancestralidade dos cromossomos B de *Prochilodus*
associado ao gene ribossômico 45S

RESUMO

A estrutura, função e comportamento dos supranumerários são completamente particulares nos diferentes grupos portadores, tornando-se difícil alcançar conclusões sobre sua origem e importância. A primeira descrição de cromossomos B em peixes deu-se em *Prochilodus lineatus*. Atualmente, são reconhecidas 38 espécies em seis famílias distintas de peixes portadores de supranumerários. Muitos estudos são realizados no intuito de decifrar a origem dos cromossomos B a qual ainda é considerada uma das maiores incógnitas da citogenética. Diante disso, o presente estudo objetivou a busca de informações sobre a origem e relações evolutivas dos cromossomos B de *P. lineatus* e *Prochilodus nigricans* por meio do isolamento de seus respectivos supranumerários pela técnica de microdissecção cromossômica seguida de amplificações do DNA genômico e do DNA dos B microdissectados destas espécies utilizando-se de *primers* de sequências repetitivas (45S, 5S, H3 e H4). A presença de genes ribossômicos compartilhada entre os cromossomos A e B em *P. nigricans* levantou vários indícios sobre a sua suposta origem, entretanto, não foi encontrada nenhuma sequência comum entre os supranumerários e os elementos do conjunto padrão A em *P. lineatus*. Diante disso, várias hipóteses sobre a origem destes elementos extra em nível de gênero e espécie foram discutidas. Dentre estas pudemos destacar uma suposta origem independente dos B neste gênero. Entretanto, uma origem comum destes elementos nas duas espécies analisadas não foi descartada. Estas e outras questões foram discutidas sob o enfoque evolutivo e de manutenção dos supranumerários no genoma hospedeiro destes *Prochilodus*.

INTRODUÇÃO

Os cromossomos B são cromossomos extras presentes em alguns indivíduos de inúmeras espécies de eucariotos. Em muitos casos estes elementos comportam-se como um genoma parasita e são mantidos na população natural devido a mecanismos de acumulação específicos, apesar de serem constantemente refutados pelo genoma hospedeiro. A grande maioria são cromossomos heterocromáticos composto de DNA repetitivo, geralmente inerte (Camacho et al., 2000).

Extensivos estudos com DNAr em supranumerários têm demonstrado um grande número de B portadores de *cistrons* DNAr 45S (Maluszynska e Schwizer, 1989; López-Léon et al., 1994, 1999; Jones 1995; Donald et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Stitou et al., 2000; Dhar et al., 2002; Szcerbal e Switonski, 2003).

Não há uma elucidação definitiva quanto à origem dos cromossomos B. Há muitas hipóteses que tentam explicar os diversos caminhos que os supranumerários possam ter sido originados (Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Berdnikov et al., 2003; Jones e Houben, 2003). É muito provável que tiveram distintas origens nos diversos organismos portadores.

Existem duas teorias que explicam a origem dos supranumerários; a intra-específica onde os cromossomos B apresentam alta similaridade com seu conjunto autossômico A, porém seguem seus caminhos evolutivos independentemente (Jamilena et al., 1994a, 1995b; Houben et al., 1996; Peppers et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Camacho et al., 2000) e a interespecífica na qual os cromossomos B surgem a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo

processo de hibridação (Sapre e Deshpande, 1987; Eickbush et al., 1992; McVean, 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001).

Em *Crepis capillaris*, toda a sequência de DNA de cromossomo B isolada por microdissecção cromossômica, também esteve presente em seu conjunto padrão A, porém não foi possível identificar a exata origem do supranumerário em relação ao par específico de cromossomo autossômico (Jamilena et al., 1994). Diversos outros estudos com sequências repetitivas isoladas de cromossomos B mostraram alta similaridade com a do conjunto A como em *Zea mays* (Alfenito e Birchler, 1993; Cheng e Lin, 2003), *Brachycone dichromasomatica* (Leach et al., 1995; Houben et al., 2001), *Secale cereale* (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993; Cuadrado e Jouve, 1994; Houben et al., 1996), *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995).

Recentemente, Teruel et al. (2010) encontraram sequências das histonas H3 e H4 compartilhadas entre os cromossomos A e B, suportando a hipótese de que os cromossomos B em *Locusta migratoria* teriam surgido do cromossomo 8. Muñoz-Pajares et al. (2011) desenvolveram marcador B-SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) para cromossomo B de *Eyprepocnemis plorans* e observaram um compartilhamento de duas sequências comuns entre os cromossomos A e B, suportando a hipótese de origem intra-específica. Estes são alguns exemplos sobre a organização molecular dos supranumerários, no entanto, muito ainda deve ser estudado sobre a composição de seu DNA, pois estes elementos extras frequentemente são considerados heterocromáticos tornando-se susceptíveis às mutações contínuas por se tratar de um material genético altamente repetitivo (López-Léon et al., 1993; Bakkali e Camacho, 2004). Diante disso, o presente estudo visou encontrar indícios sobre a origem e relações evolutivas dos cromossomos B em duas espécies de peixes neotropicais portadoras de supranumerários do gênero

Prochilodus (*Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*) por meio do isolamento dos supranumerários pela microdissecção cromossômica seguida de amplificações gênicas do produto microdissectado e do DNA genômico de ambas as espécies utilizando *primers* de sequências repetitivas.

MATERIAIS e MÉTODOS

Foram utilizados 10 exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil, bacia do Paraná e quatro indivíduos de *Prochilodus nigricans* provenientes do rio Araguaia, Tocantins, Brasil.

O método de estimulação mitótica foi utilizado para análise citogenética, por meio da técnica de injeção de solução de fermento no indivíduo induzindo a mitose conforme descrito por Cole e Leavens (1971) e adaptada para peixes por Oliveira et al. (1988), posteriormente foram obtidas as suspensões diretas de células renais de acordo com o método utilizado por Foresti et al. (1981).

Preparações cromossômicas dos indivíduos portadores de B em *P. lineatus* e *P. nigricans* após a fixação em Carnoy foram ressuspendidas em metanol puro e posteriormente, estocadas a 4º para a realização da microdissecção cromossômica.

O DNA genômico destas duas espécies utilizadas foi extraído pelo kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), conforme as instruções do fabricante. O DNA dos cromossomos B de *P. lineatus* e *P. nigricans* foi obtido pela técnica de microdissecção cromossômica de acordo com Ludecke et al. (1989) e Zhou e Hu (2007) e amplificado por DOP-PCR (Telenius et al. 1992).

Tanto o DNA genômico como o DNA dos supranumerários de ambas as espécies foram submetidos a amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

utilizando vários *primers* de sequências repetitivas (45S, 5S, H3 e H4) no intuito de averiguar supostas similaridades destas sequências gênicas entre os cromossomos A e B destes portadores.

O DNAr 45S foi amplificado utilizando os *primers* universais 18S e ITS4 (White et al., 1990) o qual foi desenhado a partir das sequências dos 18S e 28S, respectivamente, amplificando fragmentos que incluem o espaçadores ITS1 e ITS2 e o DNAr 5.8S com os DNAr 18S e 28S flanqueando as regiões. O PCR foi realizado em: 18.2 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2.0 µl de dNTP (2µM), 0.5 µl de cada *primer* (10mM), 0.3 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.0 µl de DNA genômico. A reação de amplificação deu-se nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 34 ciclos a 90°C (30s), 55°C (30s) e 72°C (30s) com extensão final de 72°C por 7 minutos .

O DNA ribossômico 5S foi amplificado com os *primers* 5S-nRNA.F-1(5' AAC GAC CAT ACC ACG CTG AA-3') e 5SnRNA.R1 (5' –AAG CGG TCC ATC TAA GT-3'), obtidos a partir da sequência 5S rRNA em *Drosophila melanogaster* (Cabrero et al., 2003). O PCR foi realizado conforme já descrito anteriormente, excetuando-se a temperatura de anelamento a qual foi alterada para 52°C.

Os genes da histona H3 foram amplificados com *primers* H3aF (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC) e H3aR (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC) (Colgan et al.,1998). O PCR foi realizado em 17.6 µl de água Mili-Q, 2.5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2.0 µl de dNTP (2µM), 0.5 µl de cada *primer* (10mM), 0.4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1.5 µl de DNA genômico. As condições foram: 5 minutos de desnaturação a 95°C, 30 ciclos a 94°C (15s), 48°C (15s) e 72°C (15s), a extensão final foi de 72°C a 7 minutos. Genes da histona H4 foram amplificados com *primers* universais H4F2s (5'-TSC GIG AYA ACA TYC AGG

GIA TCA C) e H4F2er (5'-CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT) (Pineau et al., 2005). A PCR foi realizada conforme já descrita para a amplificação da histona H3 nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 30 ciclos a 94°C (20s), 58°C (20s) e 72°C (30s) com extensão final de 72°C por 7 minutos.

Todos os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em 1:1000.

A sequência ribossômica 18S-ITS4 foi utilizada em Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) segundo Pinkel et al. (1986) e marcada com o Bionick Labeling System-Gibco. BRL de acordo com as instruções do fabricante. Esta sonda foi desnaturada em formamida 70% (2XSSC), por 5 min. O DNA foi hibridado a 37°C *overnight* em câmara úmida (1mg de sonda desnaturada, formamida 50%, 10mg/ml de sulfato de dextrano e 5mg/ml de DNA de esperma de salmão). A sonda hibridada foi detectada por reação avidina associada à FITC. As lâminas foram contracoradas com DAPI (4_6-diamidino-2-phenylindole) e fotografadas com fotomicroscópio de fluorescência (BX 61, Olympus) equipado com câmera digital refrigerada Olympus DP70, utilizando o software Pro MC 6.0.

Por fim, as Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) foram identificadas no complemento cromossômico utilizando a técnica de coloração por nitrato de Prata desenvolvida por Howell e Black (1980)

RESULTADOS

Após as amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* de DNA de sequências repetitivas (45S, 5S, H3 e H4) nos DNA genômicos de *P. lineatus* e *P. nigricans* e em seus respectivos DNA dos supranumerários microdissectados observou-se que em *P. lineatus* somente ocorreram amplificações com estes *primers* em seu DNA genômico; nenhuma amplificação correspondente a estes genes de sequência repetitiva foi observada no produto microdissectado desta espécie (figura 1a).

Em *Prochilodus nigricans* o gene ribossômico 45S obtido por amplificações com os *primers* 18S/ITS4 foi identificado tanto no DNA genômico como no DNA de seu cromossomo B microdissectado (figura 1 b). Diante disso, tornou-se evidente um compartilhamento desta sequência entre o supranumerário e o conjunto padrão A nesta referida espécie. Todavia estudos envolvendo análises comparativas entre estas duas sequências tornam-se necessários para obtermos um melhor índice de similaridade existente entre os cromossomos A e B em *P. nigricans*.

Os genes 5S, H3 e H4 utilizados em amplificações em *P. nigricans* foram observados somente em seu DNA genômico, nenhuma destas sequências repetitivas foi detectada no produto microdissectado.

Para comprovar o compartilhamento das sequências ribossômicas entre os cromossomos A e B de *P. nigricans* construiu-se uma sonda deste referido gene para, posteriormente, ser utilizada em Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em ambas as espécies de *Prochilodus* portadoras de B.

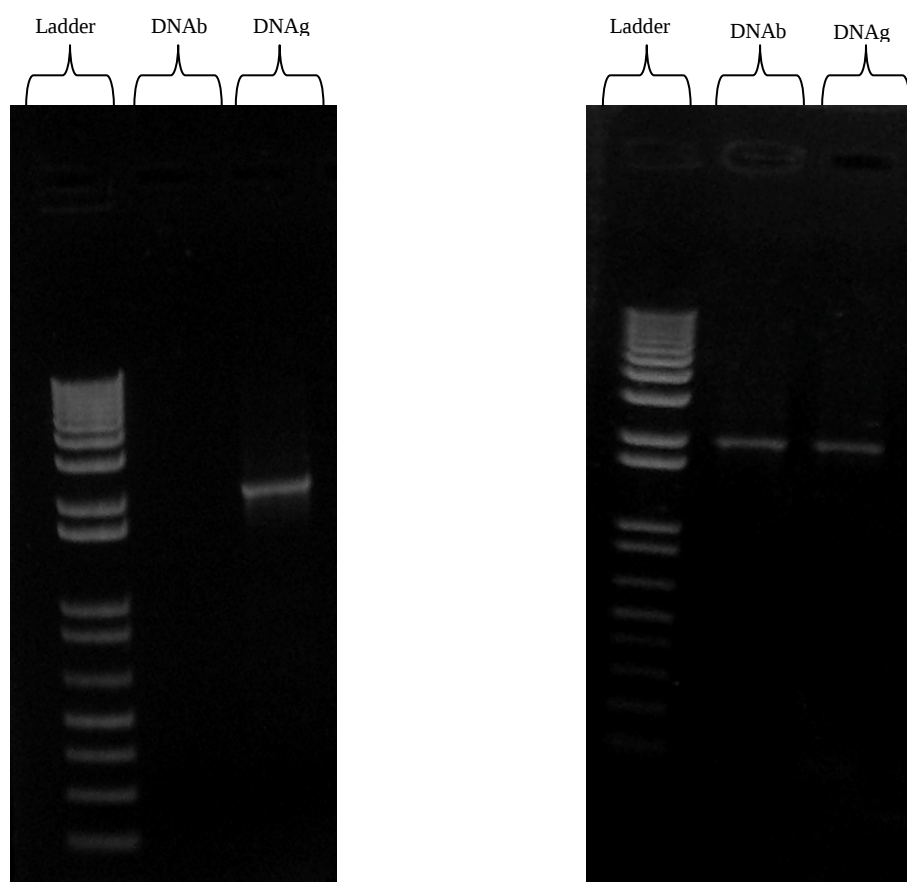


Figura 1. Amplificações do gene ribossômico em **(a)** utilizando o DNA microdissectado do cromossomo B (DNAb) e o DNA genômico (DNAg) em *P. lineatus* onde se observou ampliações somente no DNA genômico desta espécie. Em **(b)** tanto o DNA genômico (DNAg) como o DNA microdissectado do cromossomo B (DNAb) de *P. nigricans* mostram-se amplificados.

Com a utilização da Hibridação *in situ* Fluorescente foi constatado que em *P. lineatus* não houve um compartilhamento de DNA ribossômico entre os cromossomos A e B, pois a marcação correspondente a este gene somente foi evidenciada no braço longo do segundo par de cromossomos submetacêntrico (figura 2a). Em *P. nigricans* tanto o segundo par de cromossomos submetacêntrico como seu respectivo cromossomo supranumerário compartilhavam sequências ribossômicas em comum (figura 2b).

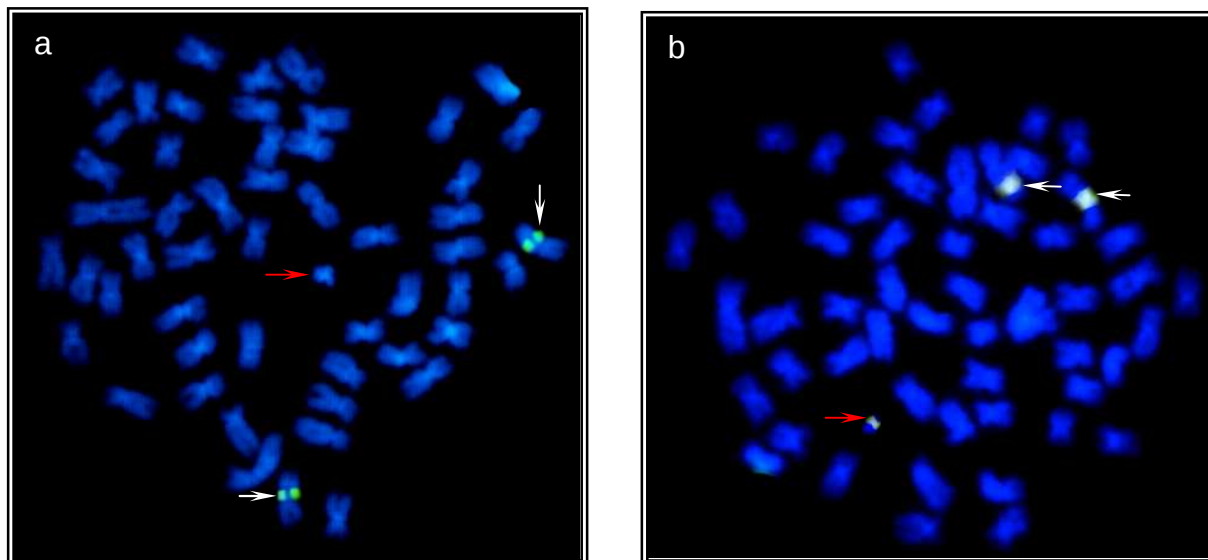


Figura 2. Hibridação *in situ* Fluorescente com sonda de DNAr em **(a)** metáfase de *P. lineatus* e em **(b)** metáfase de *P. nigricans*. Em **(b)** observou-se o compartilhamento desta sequência entre os cromossomos A (setas brancas) e B (seta vermelha) em **(a)** somente os cromossomos A mostraram homologia com a sonda (setas brancas) o cromossomo B não apresentou sinais de hibridação (seta vermelha).

Diante deste compartilhamento do gene ribossômico entre os cromossomos A e B em *P. nigricans* evidenciado por meio da utilização da sonda de DNAr associada a FISH, utilizou-se da técnica clássica de localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) da impregnação por nitrato e Prata somente neste exemplar e constatamos a não existência de regiões ativas de DNAr (figura 3), pois não ocorreu a marcação da NOR no cromossomo B.



Figura 3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) em metáfase de *P. nigricans* (setas pretas). O cromossomo B (seta vermelha) não apresentou esta marcação demonstrando inatividade nesta região.

DISCUSSÃO

Estudos moleculares nas últimas duas décadas têm mostrado que os cromossomos B na maioria das plantas e animais contêm sequências de DNA repetitivas, como DNA ribossomal, DNA centromérico, DNA telomérico e elementos móveis (Camacho, 2005). Em somente dois casos como no fungo *Nectria haematococca* (Miao et al., 1991) e em várias espécies de Canidae (Graphodastky et al., 2005; Yudkin et al., 2007) genes codificantes de proteínas foram encontrados nos supranumerários.

Com o advento das técnicas moleculares sofisticadas o estudo da composição dos cromossomos B nos diversos organismos portadores tornou-se acessível. Em 1990, emergiu a revolucionária técnica envolvendo a microdissecção de cromossomos específicos e a amplificação deste DNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), o qual puderam ser clonados, marcados e utilizados em pinturas cromossômicas associadas à Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). Esta técnica foi utilizada primeiramente por McQuade et al. (1994) para isolar DNA de cromossomos B no marsupial *Petauroides volans*. Hoje, tal metodologia tem sido empregada nos estudos cromossômicos envolvendo, principalmente, os supranumerários em diversas espécies de animais e plantas portadoras.

Utilizando-se da técnica de microdissecção cromossômica foram obtidos dois produtos microdissectados de cromossomos B em *Prochilodus* um proveniente de *Prochilodus lineatus* e outro de *Prochilodus nigricans*. Após a realização de amplificações com *primers* de sequências repetitivas (45S, 5S, H3 e H4) tanto no DNA genômico quanto no microdissectado de ambas as espécies, pode-se constatar

que em *P. lineatus* não houve detecção de sequências compartilhadas entre seu DNA genômico e o DNA de seu respectivo supranumerário (figura 2a).

Diante disso, algumas hipóteses puderam ser levantadas quanto à origem do cromossomo B nesta espécie. A primeira associou este cromossomo B a uma origem independente do A seja por hibridação interespecífica (Sapre e Deshpande, 1987; Eickbush et al., 1992; McVean, 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001), ou mesmo por formação de cromossomos B por um simples processo metabólico celular (Foresti et al., 1998; Voltolin et al., 2010c). Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que este elemento extra em *P. lineatus* é caracterizado por uma invasão não-recente e encontra-se neutralizado conforme previsto por Oliveira et al. (1997) e Cavallaro et al., (2000) e comprovado por Voltolin et al. (2010b). Este estágio de neutralização caminha sob duas vertentes, ou seja, os supranumerários podem não sofrer processos mutacionais e serem controlados por mecanismos de defesa do conjunto genômico A acarretando sua eminente expulsão das células hospedeiras seguida de sua extinção. Por outro lado, a principal característica da maioria dos supranumerários é o parasitismo. Diante de uma neutralização evidente conforme descrita para *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu os supranumerários tornar-se-iam susceptíveis a grandes mutações ao longo dos anos, ocasionando diferenciação de sua heterocromatina em relação aos cromossomos ancestrais A, reiniciando um ciclo invasivo conforme descrito por (Herrera et al., 1996; Zurita et al., 1998). Desta forma o B garantiria sua existência dentro do genoma hospedeiro, mas apresentaria sequências totalmente diferentes do par ou pares cromossômicos que os originaram, tornando-se muito difícil decifrar sua exata origem.

Esta diferença de sequências quanto ao DNA dos supranumerários e seus respectivos cromossomos do conjunto padrão A também foi observado por Maistro et al. (2000) ao utilizarem enzima de restrição *Bam*H1 em exemplares de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu portadores de B. Estes autores observaram a existência de diferentes classes de DNA altamente repetitivas entre o genoma desta espécie e seus supranumerários. A existência destas diferentes composições de cromatina entre estes dois conjuntos cromossômicos indicou que a origem dos cromossomos B em *P. lineatus* não seria um evento recente, apresentando um tempo suficiente para a acumulação de algumas modificações na sua estrutura durante seu processo evolutivo (Maistro et al., 2000). Diante disso, a falta de homologia de sequências entre os cromossomos A e B em *P. lineatus* observado neste trabalho pode estar em concordância com os dados de Maistro et al. (2000).

Em *Prochilodus nigricans*, no entanto, ao realizarmos um estudo comparativo entre as sequências de seu DNA genômico e de seu supranumerário, por meio da utilização de *primers* de sequências repetitivas pudemos constatar que tanto o DNA genômico quanto microdissectado compartilhavam sequências ribossômicas (45S) (figura 2b). No entanto, os outros genes utilizados neste estudo (5S, H3 e H4) amplificaram-se somente no DNA genômico desta espécie.

Teruel et al. (2010) realizaram um estudo da origem dos cromossomos B em *Locusta migratoria* utilizando-se destes mesmos *primers* de sequências repetitivas e constataram que as histonas H3 e H4 compartilhavam sequências comuns com o DNA genômico desta espécie. Após a realização da Hibridação *in situ* Fluorescente estes autores puderam constatar que o B provavelmente se originou do cromossomo oito.

A presença de DNA ribossômico no cromossomo B de *P. nigricans* pode supor que sua origem esteja vinculada ao par cromossômico correspondente da NOR (braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico) (figura 3). Por se tratar de uma região sintênica com o gene 5S, há uma intensiva atividade ribossômica neste local tornando-o susceptível a eventuais quebras que poderia ter resultado no surgimento do cromossomo B em *P. nigricans*. De acordo com Martins e Galetti (1999) a localização do gene 5S e 45S em distintos cromossomos apresentam algumas vantagens quando comparadas à condição sintênica. Os *clustres* de DNAr 5S e 45S quando ligados facilitam transposições causando interferências disruptivas na estrutura e função dos genes podendo ocasionar quebras estruturais. Camacho et al. (2000) ao analisarem a presença de NOR no conjunto dos autossômicos sugeriram que esta região apresenta uma grande tendência em promover quebras cromossômicas e é considerada uma das maiores responsáveis pela formação dos supranumerários em algumas espécies de plantas e animais.

Todavia, não se pode descartar também a possibilidade de que este gene ribossômico em algum momento na história evolutiva de *P. nigricans* tenha se associado a transposons conforme descrito no capítulo 3 deste trabalho e ter-se incorporado no cromossomo B ao acaso, desta forma, o par cromossômico portador na NOR são seria o precursor de sua origem.

Existem inúmeras explicações para justificar a presença de sequências ribossômicas nos supranumerários dentre estas se destacam: o DNA ribossômico 45S é mais susceptível à quebra, possivelmente porque sua localização cromossômica usualmente está ao final das cromátides; o DNA ribossômico 45S é mais susceptível ao isolamento meiótico, porque tem pouco ou nenhum *crossing*

over e a disjunção cromossômica é mais tardia (anáfase I), além disso, apresentam tempos distintos de expressão comparados ao resto do genoma; cromossomos B desprovidos de sequências ribossômicas 45S podem surgir, mas facilmente obtêm fragmentos hipertransponíveis de DNA ribossômico (Schubert e Wobus, 1985; Beukeboom, 1994; Jones, 1995).

Os cromossomos B em muitas espécies têm sido abrigo para os genes ribossômicos (Camacho 2005). Em muitos casos, estes genes foram detectados por simples impregnação por nitrato de Prata, pois se tratava de genes ribossômicos ativos. Entretanto, somente com o surgimento da Hibridação *in situ* Fluorescente muitos casos de DNAr presente nos cromossomos B foram revelados, conforme também observado neste trabalho, pois somente com nitrato de Prata não seria possível detectar a presença deste gene no cromossomo B de *P. nigricans* (figura 3).

A homologia entre o DNA genômico e microdissectado das sequências ribossômicas em *P. nigricans* e ao mesmo tempo a ausência de qualquer homologia entre o DNA genômico e o DNA microdissectado em *P. lineatus* nos leva a incitar duas hipóteses sobre a origem dos cromossomos B neste gênero. Os supranumerários nestas duas espécies poderiam ter-se originado de maneira distinta por diversos caminhos independentes. No peixe *Alburnus alburnus* a técnica de RFLP revelou a presença de uma sequência específica de B a qual mostrou forte similaridade com os retrotransposons *GYpsy/Ty3* de drosófila (Ziegler et al., 2003). No entanto, este mesmo DNA não foi detectado nos cromossomos A deste peixe assim como nos cromossomos A e B de outro peixe intimamente relacionado, *Rutilus rutilus*, sugerindo desta forma uma origem independente dos cromossomos B nestes dois animais.

Uma origem independente dos supranumerários conforme descrito acima para estas duas espécies de peixes poderia ser uma das inúmeras respostas quanto à origem dos B em *Prochilodus*. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que em *P. lineatus* o B pode ter surgido anteriormente aos supranumerários de *P. nigricans*. Esta invasão não-recente dos microcromossomos em populações naturais de curimatá no rio Mogi-Guaçu foi comprovada devido ao estágio de neutralização observado por Voltolin et al. (2010b) onde o índice de instabilidade mitótica (MI) foi igual a zero. No entanto, ao observarmos a frequência de supranumerários entre exemplares de *P. nigricans* observamos que somente um indivíduo entre todos os exemplares coletados apresentou um cromossomo B que variava intra-individualmente demonstrando, desta forma, instabilidade mitótica e toda instabilidade reflete em acúmulo que é uma característica invasiva dos B em seu estágio inicial dentro de uma população. Porém esta foi apenas uma simples análise sobre a dinâmica destes elementos extras em *P. nigricans*, no entanto, nos permitiu tirarmos estas conclusões.

O suposto surgimento anterior dos cromossomos B em *P. lineatus*, desencadeou inúmeras modificações nas sequências de DNA dos B ao longo dos anos que repercutiram na ausência de sequências incomum entre os supranumerários e seus cromossomos ancestrais. Em *P. nigricans* por se tratar de uma invasão recente, ainda observada nos dias atuais, foi possível observar genes incomuns entre os cromossomos A e B. Diante disso, podemos supor que em ambas as espécies os cromossomos B tiveram uma origem comum, porém seguiram caminhos evolutivos independentes. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que cada B exibe suas próprias particularidades e devem ser estudados de maneira particular. Neste trabalho foi encontrado um B em *P. nigricans* que

compartilha sequências comuns do gene 45S com o conjunto autossômico, mas este supranumerário não pode ser considerado o único responsável pela origem dos microcromossomos em *Prochilodus*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados na literatura demonstram que peixes do gênero *Prochilodus* estudados citogeneticamente exibem características cromossômicas conservadas. Tal conservadorismo pode estar associado ao seu modo de vida, pois são considerados migradores por excelência e estão distribuídos ao longo das maiores bacias hidrográficas da América do Sul. Estes fatores permitem maiores fluxos gênicos entre estas espécies.

Sob o ponto de vista citogenético, todos os indivíduos pertencentes ao gênero *Prochilodus* apresentam um número diploide de 54 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico com número fundamental igual a 108. A utilização de marcadores citogenéticos clássicos como a impregnação por nitrato de Prata na detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) nos revelou marcações simples no braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico para *Prochilodus brevis*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans*. Em *Prochilodus argenteus* foi detectada uma marcação única no braço longo do segundo par de cromossomo submetacêntrico seu homólogo, entretanto, demonstrou NOR inativa. Esta pequena característica que nos permitiu diferenciar *P. argenteus* das demais espécies utilizadas neste trabalho. Este foi apenas o primeiro indício de que o genoma não é composto por sequências de DNA estável, ou seja, pequenas alterações a nível cromossômico colocam a prova o conservadorismo citogenético postulado para o gênero *Prochilodus*.

Utilizando-se da técnica de Híbridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 18S em todos os *Prochilodus* mencionados acima

constatamos um padrão sintênico para estes dois genes, inclusive a Região Organizadora de Nucléolo considerada inativa pela impregnação por nitrato de Prata em *P. argenteus* foi evidenciada pela FISH com sonda 18S. A condição de sintenia torna esta região cromossômica muito susceptível a quebras e outros rearranjos desencadeando, algumas modificações citogenética entre os exemplares deste gênero. Diante disso, a inativação da NOR de um cromossomo em *P. argenteus* detectada pela impregnação por nitrato de Prata, poderia ser considerada um pequeno indício de supostos rearranjos cromossômicos estruturais que poderiam ter ocorrida nesta espécie ao longo dos anos.

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva detectada pelo bandamento C revelou a presença de blocos conspícuos predominantemente na região centromérica em todos os *Prochilodus* analisados. No entanto, somente em *P. lineatus* não foi observado um grande bloco heterocromático no braço longo do quinto par de cromossomo submetacêntrico diferenciando-o das outras espécies de *Prochilodus* analisadas.

Desta forma, os dados concernentes à caracterização citogenética por meio da utilização de marcadores convencionais em peixes do gênero *Prochilodus* concordam apenas em um conservadorismo quanto ao número e morfologia cromossômica. Muitas alterações cromossômicas vêm ocorrendo ao longo dos anos nestas populações localizadas em distintas bacias hidrográficas. Neste trabalho descrevemos pequenas mudanças relacionadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo em *P. argenteus* ou no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva conforme observado em *P. lineatus*, porém diversas modificações cromossômicas ainda não registradas certamente vêm ocorrendo neste gênero, seja por pressões seletivas genéticas e/ou ambientais.

A presença de cromossomos supranumerários em algumas espécies do gênero *Prochilodus* torna estes animais um excelente alvo para estudos citogenéticos envolvendo aspectos quanto à origem, herança, estrutura, manutenção e dinâmica evolutiva do elemento B nos genomas hospedeiros.

Cromossomos B são considerados elementos dispensáveis presentes no genoma de alguns indivíduos em algumas espécies de animais, plantas e fungos. Geralmente apresentam-se heterocromáticos e são transmitidos por um comportamento meiótico irregular.

Toda e qualquer análise relativa à herança de alguma característica deve ser estudada sob a expectativa mendeliana. Com base neste contexto foi realizado o estudo da herança dos cromossomos supranumerários em curimatás (*P. lineatus*) provenientes do rio Mogi-Guaçu por meio de cruzamentos dirigidos. Os resultados demonstraram uma taxa de transmissão mendeliana para os cromossomos supranumerários desta referida espécie. Isto pode estar relacionado a um processo de não-acumulação dos elementos B nesta população, devido à estabilidade mitótica. Esta não-acumulação reflete em um estágio de neutralização dos supranumerários, comprovado neste trabalho pela análise de célula gamética, os quais podem sofrer mutações e iniciar um novo ciclo invasivo ou simplesmente, serem extintos do genoma hospedeiro. É importante salientar que nesta fase neutra, os cromossomos B caminham sob duas vertentes, ou seja, podem trazer benefícios ou malefícios ao genoma hospedeiro, mas estas respostas somente serão reveladas ao longo de sua história evolutiva.

No intuito de se encontrar relações quanto à origem dos cromossomos supranumerários entre os elementos genômicos A e B nos diversos organismos portadores uma infinidade de sondas envolvendo DNA repetitivos, famílias

multigênicas, DNA ribossômico e até mesmo o isolamento de sequências específicas de supranumerários tem sido utilizada em associação com a técnica de Híbridação *in situ* Fluorescente (FISH).

Neste estudo, além de buscarmos explicações sobre a herança dos supranumerários em *Prochilodus*, mais especificamente em *P. lineatus*, realizamos o mapeamento dos B nas duas espécies portadoras *P. lineatus* e *P. nigricans* utilizando sondas do elemento retrotransponível Rex1 e histonas H3 e H4. Nosso intuito foi o de conhecer melhor a estrutura destes elementos extras, além de associar alguns dados obtidos a sua suposta origem neste gênero.

O padrão de distribuição da Rex1, H3 e H4 mostrou-se predominantemente conservado no complemento A das duas espécies de *Prochilodus* analisadas. O elemento retrotransponível Rex1 assim como a histona H3 apresentaram-se dispersas por todo o genoma, levando-nos a considerar uma suposta associação de co-dispersão destas duas sequências ao longo genoma destas espécies. No entanto, a histona H4 mostrou homologia somente no braço curto do quarto par de cromossomo submetacêntrico não ocorrendo marcações nos cromossomos B.

Os supranumerários, entretanto, não exibiram conservadorismo relacionado ao padrão de distribuição das sondas Rex1 e H3, ou seja, o elemento retrotransponível mostrou homologia com todos os B, porém em graus diferenciados para ambas as espécies. O mesmo não pode ser observado para a família da histona H3, pois a maioria dos elementos extras exibiu similaridade com a sonda, entretanto, alguns supranumerários não foram marcados. Diante disso, foi comprovado que os supranumerários apresentam suas particularidades entre espécies relacionadas e até mesmo dentro do próprio genoma. Considerados os elementos egoístas presentes nos indivíduos hospedeiros, estes cromossomos

extras quando originados, seja de forma intra-específica ou interespecífica, seguem caminhos evolutivos independentes e ao longo dos anos adquirem uma conformação de DNA diferenciado. Isto pode dificultar estudos sobre sua origem nas plantas e animais portadores. As sondas Rex1 assim como a histona H3 compartilharam sequências comuns entre os cromossomos A e B, porém identificar o par ou pares precursores de sua origem torna-se uma tarefa muito difícil, devido ao alto grau de dispersão destas sequências ao longo dos genomas analisados.

Atualmente, técnicas inovadoras vêm sendo empregadas no estudo das sequências e no mapeamento cromossômico. Dentre elas destaca-se a microdissecção cromossômica, considerada uma das melhores metodologias para isolar cromossomo ou cromossomos preteridos. Diante disso, utilizamos desta técnica para o isolamento e construção de duas sondas específicas de supranumerários, uma de *P. lineatus* e outra *P. nigricans*, ambas portadoras de B. Em associação com a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) simples e cruzada alguns indícios sobre a origem dos B neste gênero foram revelados.

Os resultados demonstraram homologia somente dos supranumerários com a sonda, nenhum cromossomo A foi marcado. Esta similaridade entre os cromossomos B identificada por estas duas sondas em FISH simples e cruzada poderia estar associada a uma origem comum para os cromossomos B neste gênero. Entretanto, por se tratar um DNA altamente repetitivo estas homologias podem ocorrer, porém isto não significa uma origem comum. As diferenças quanto ao grau de homologia dos supranumerários, principalmente em Hibridação *in situ* cruzada demonstraram que os B de *P. lineatus* e *P. nigricans* não apresentam sequências de DNA idênticas isto pode favorecer os resultados concernentes a uma origem independente dentro deste gênero. Todavia, não se pode descartar a

hipótese de que os supranumerários dentro de um mesmo organismo exibem também suas próprias particularidades, mesmo apresentando uma origem comum, pois são considerados elementos cromossômicos independentes e, conseqüentemente, quando originados trilham seus próprios caminhos evolutivos. Estes e outros questionamentos podem surgir, pois se trata da aplicação de uma técnica de pintura cromossômica utilizando-se de uma sonda única contendo todos os genes possíveis presentes nos supranumerários. No entanto, não se pode descartar a utilização de sondas por pinturas cromossômicas associada à FISH, pois esta metodologia trouxe resultados conclusivos sobre a origem dos supranumerários em muitas espécies portadoras descrita na literatura.

Diante desta dificuldade em encontrar indícios sobre a origem dos microcromossomos em *Prochilodus* realizamos um extenso trabalho comparativo entre as sequências do DNA contido nos cromossomos B isolados pela técnica de microdissecção cromossômica e o DNA genômica de *P. lineatus* e *P. nigricans* por meio de amplificações de sequências repetitivas utilizando os *primers* (45S, 5S, H3 e H4). Em *P. lineatus* não foi encontrado nenhum compartilhamento destas sequências entre os cromossomos A e B. Em *P. nigricans*, entretanto, a sequência 45S foi considerada comum entre o supranumerário e o segundo par cromossômico submetacêntrico. Diante deste resultado poderíamos questionar se o segundo par de cromossomos submetacêntrico portador do gene ribossômico seria o ancestral do cromossomo B em *P. nigricans*. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que este gene em alguma fase evolutiva neste indivíduo poderia ter se associado a transposons, pois neste trabalho observamos que os cromossomos B em *Prochilodus* estão repletos de elementos saltatórios e estes poderiam ter servido

como vetores para a condução do gene ribossômico ao cromossomo B nesta espécie ao acaso.

A ausência de um compartilhamento de genes entre os cromossomos A e B em *P. lineatus* e a suposta origem dos cromossomos B em *P. nigricans* a partir do cromossomo portador do gene ribossômico nos leva a acreditar em uma origem independente do elemento B em *Prochilodus*. Porém, devemos considerar que o genoma de *P. lineatus* poderia ter compartilhado esta sequência ribossômica entre os cromossomos A e B anteriormente, conforme hoje observado em *P. nigricans*. No entanto, não há mais indícios de compartilhamento deste gene ribossômico de *P. lineatus*, pois o DNA dos supranumerários desta espécie poderia ter sofrido grandes modificações ao longo dos anos quando comparada ao DNA dos B de *P. nigricans*.

Estes são alguns dos inúmeros questionamentos que são levantados quando se trata da origem dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus*, pois estes parecem apresentar uma dinâmica evolutiva própria tornando-se difícil alcançar rápidas conclusões utilizando-se de um único cromossomo B isolado.

Reunindo todas as informações concernentes ao mapeamento, herança, origem e dinâmica dos supranumerários nos *Prochilodus* distribuídos em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul, torna-se imprescindível a realização de futuras análises moleculares envolvendo a utilização de sequências de DNA mitocondriais, por exemplo, que nos permita relacionar as espécies de *Prochilodus* com a origem dos supranumerários neste gênero. Desta forma, comprovaríamos ou refutaríamos uma suposta origem independente dos supranumerários nesse gênero e ao mesmo tempo dataríamos o surgimento do primeiro B em *Prochilodus*.

Estudos envolvendo amplificações gênicas do DNA específico dos cromossomos B são considerados elucidativos na busca da origem dos

supranumerários nos diversos organismos portadores. Porém, cada supranumerário até mesmo contido dentro de um mesmo genoma deve ser analisado separadamente. Diante disso, concluímos que os supranumerários são elementos independentes e considerados com “vida própria.” Para encontrarmos sua exata origem, devemos realizar estudos envolvendo todos os B dos organismos portadores, mas ao mesmo tempo teremos que saber discernir suas próprias particularidades, pois cada cromossomo B é único e a análise de um único B não pode responder a origem de todos os outros supranumerários.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENITO, MR; BIRCHLER, JA (1993) Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 135:589-597.
- ALMEIDA-TOLEDO, LF; OZOUF-COSTAZ, C; FORESTI, F; BONILLO, C; PORTO-FORESTI, F; DANIEL-SILVA, MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res.* 97:229-233.
- ARTONI, RF; VICARI, MR; ENDLER, AL; CAVALLARO, ZI; JESUS, CM; ALMEIDA, MC; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC (2006) Banding pattern of A and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetica* 127:277-284.
- AUGER, DL; BIRCHLER, JA (2002) Maize tertiary trisomic stocks derived from B-A translocation. *Journal of Heredity* 93:42-47.
- BAKKALI, M; CAMACHO, JPM (2004) The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: III. Mutation rate of B chromosomes. *Heredity* 92:428-433.
- BAKKALI, M; PERFECTTI, F; CAMACHO, JPM (2002) The B-Chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: II. Parasitic and Neutralized B1 Chromosome. *Heredity* 88:14-18.
- BATTAGLIA, E (1964) Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia*, 17: 245-&.
- BECKETT, JB (1991) Cytogenetic, genetic and plant breeding applications of B-A translocation in maize. Gupta, PK, Tsuchiya, T eds. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution Part A*. Oxford: Elsevier 493-529.

- BERDNIKOV, VA; GOREL, FL; KOSTERIN, OE; BOGDANOVA, VS (2003) Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. *Heredity* 91:577-583.
- BEUKEBOOM, LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome Conference. *Heredity* 73:328-336.
- BIDAU, CJ; MARTÍ, DA (2004) B-chromosome and Robertsonian fusion of *Dichroplus pratensis* (Acrididae): Intraspecific support for the centromeric drive theory. *Cytogenetic Genoma Research* 106:347-350.
- BIRCHLER, J (1991) Chromosome manipulation in maize. Gupta, PK, Tsuchiya, T eds. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution Part A*. Oxford: Elsevier 531-559.
- BLUNDEN, R; WILKES, TJ; FORSTER, JW; JIMENEZ, MM; SANDERY, MJ; KARP, A; JONES, RN (1993) Identification of the E3900 family, a 2nd family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome* 36:706-71.
- BONETTO, AA (1986) The Paraná river system. In *The ecology of river systems* (B.R. Davies & K.F. Walker, eds.). Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht 541-555p.
- BORN, GG; BERTOLLO, LAC (2000) An XX/XY Sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8:111-118.
- BOSEMARK, NO (1957) On accessory chromosomes in *Festuca pratensis* .5. Influence of accessory chromosomes on fertility and vegetative development. *Hereditas* 43: 211-235.
- BOSEMARK, NO (1954) On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. II. Inheritance of the standard type of accessory chromosome. *Hereditas* 40:425-437.

- BOUGOURD, SM; JONES, RN (1997) B-chromosome: a physiological enigma. *New Phytol.* 137:43-54.
- BOUGOURD, SM; PLOWMAN, AB (1996) The inheritance of chromosome in *Allium schoenoprasum* L. *Chromosome Research* 4:151-158.
- BOWEN, SM (1983) Detritivory in neotropical fish communities. *Environ. Biol. Fish.* 9:137-144.
- BRITSKI, HA (1972) Peixes de água doce do estado de São Paulo. *Sistemática* 36:79 108.
- BRUM, MJ; MURATORI, CFML; LOPES, PRD; VIANNA, PRG (1998) A ictiofauna do sistema lagunar de Marica (RJ). *Acta Biol Leopoldensia* 16:45-55.
- BUCKUP, PA; MENEZES, NA; GHAZZI, MS (eds.) (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 195p.
- BUGROV, AG; KARAMYSHEVA, TV; PEREPELOV, EA; ELISAPHENKO, EA; RUBTSOV, DN; WARCHALOWSKA-SLIWA, E; TATSUTA, H; RUBTSOV, NB (2007) DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research* 15:315-326.
- BUGROV, AG; KARAMYSHEVA, TV; RUBTSOV, DN; ANDREENKOVA, OV; RUBTSOV, NB (2004) Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet. Genome Res.* 106: 284-288.
- BURT, A; TRIVERS, RL (2006) *Genes in Conflict : The Biology of Selfish Genetic Elements*. Belknap Press, Harvard.

- CABRAL-DE-MELLO, DC; MARTINS, C; SOUZA, MJ; MOURA, RC (2011a) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenet. Genome Res.* 132: 89–93.
- CABRAL-DE-MELLO, DC; MOURA, RC; MARTINS, C (2011b) Cytogenetic mapping of rRNA and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae. Scarabaeinae) beetles. *Cytogenet. Genome Res.* 134:127-135.
- CABRAL-DE-MELLO, DC; MOURA, RC; MARTINS, C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 104: 393–400.
- CABRAL-DE-MELLO, DC; MOURA, RC; MARTINS, C (2009) Chromosomal mapping of repetitive DNA in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 1-8.
- CABRERO, J; LÓPEZ-LEÓN, MD; TERUEL, M; CAMACHO, JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res.* 17:397–404.
- CABRERO, J; BAKKALI, M; BUGROV, A; WARCHALOWSKA-SLIWA, E; LÓPEZ-LEÓN, MD, (2003) Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* . *Chromosoma* 112: 207–211.

- CABRERO, J; LÓPEZ-LÉON, MD; BAKKALI, M; CAMACHO, JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 83:435-439.
- CAMACHO, JPM (2005) B Chromosome. In: Gregory TR (ed) The evolution of genome. Elsevier, USA 223–286p.
- CAMACHO, JPM; SHARBEL, TF; BEUKBOOM, LW (2000) B-chromosome evolution. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 355:163-178.
- CAMACHO, JPM; SHAW, MW; LÓPEZ-LÉON, MD; PARDO, MC; CABRERO, J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Am. Nat. 149:1030-1050.
- CANO, MI; SANTOS, JL (1989) Cytological basis of the B chromosome accumulation mechanism in the grasshopper *Heteracris littoralis* (Ramb). Heredity 62:91-95
- CAPELETI, AR; PETRERE, JRM (2006) Migration of the curimbatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu river, São Paulo, Brazil. Braz. J. of Biol. 66:651-659.
- CAPPIO, LF; MARTINS, A; KIRCHNER, R (1995) O rio São Francisco. Petrópolis: Editora Vozes. 110p.
- CAPY, P; BAZIAN, C; HIGUET, D; LANGIN, T; (eds) (1998) Dynamics and Evolution of Transposable Elements. Austin, London: Landes Bioscience/Chapman & Hall 1-17p.
- CARLSON, WR (1994) Crossover effects of B chromosomes may be selfish. Heredity 72:636-638.

- .CARLSON, WR; ROSEMAN, R (1992) A New property of the maize B chromosome. Genetics 131:211-223.
- CARLSON WR (1969) Factors affecting preferential fertilization in maize. Genetics 62:638-639.
- CARVALHO, RA; MARTINS-SANTOS, IC; DIAS, AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). Journal of Fish Biology 72:1907–1932.
- CASTRO, RMC (1993) *Prochilodus britskii*, a new species of Prochilodontide Fish (Ostariophysi: Characiformes) from the rio Apiacá, river Tapajós system, Mato Grosso, Brazil. Proc. Biol. Soc. Wash. 106:57- 62.
- CASTRO, RCM; VARI, PP (2004). Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study. Smithsonian Books, Washington, DC, (622), 189p.
- CAVALLARO, ZI; BERTOLLO, LAC; PERFCTTI F; CAMACHO, JPM (2000) Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. Chrom. Res. 8:627-634.
- CEBRIÁ, A; NAVARRO, ML; PUERTAS, MJ (1994) Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). American Journal of Botany. 81: 1502-1507.
- CHENG, YM; LIN, BY (2003) Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. Genetics 164:299-310.
- CHENG, ZK; YU, HX; YAN, HH; GU, MH; ZHU, LH (2000) B chromosome in a rice aneuploid variation. Theoretical and Applied Genetics, 101:564-568.

- CHIAVARINO, AM; ROSATO, M; ROSI, P; POGGIO, L; NARANJO, CA (1998) Localization of the genes controlling B chromosome transmission rate in maize (*Zea Mays* SSP. *Mays*, Poaceae). American Journal of Botany 85:1581-1585.
- CIOFFI, MB; MARTINS, C; BERTOLLO, LAC (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implication for genome change and karyoevolution in fish. BMC Evolutionary Biol. 10:271.
- COLE, CJ; LEAVENS, CR (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. Herpetol 49:102.
- COLGAN, D; MCLAUCHLAN, A; WILSON, G; LIVINGSTON, S (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Aust J Zool. 46:419–43.
- CORDIVOLA de YUAN, E (1992) Fish population of lentic environments of Paraná river. Hydrobiologia 237:159-173.
- CUADRADO, A; JOUVE, N (1994) Highly repetitive sequences in B-chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. Genome 37: 709-712.
- DA SILVA, C; HADJI, H; OZOUF-COSTAZ, C; NICAUD, S; JAILLON, O; WEISSENBACH, J; CROLLIUS, HR (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America 99:13636-13641.
- DHAR, M; FRIEBE, B; KOUL, AK; GILL, BS (2002) Origin of an apparent B chromosome by mutation chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. Chromosoma 111:332-340.

- DE ROSA, LV; FORESTI, F; MARTINS, C; OLIVEIRA, C; WASKO, AP (2008) Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). *Gen. Mol. Biol.* 31:265-269.
- DIAS, AL; FORESTI, F; OLIVEIRA, C (1998) Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). *Caryologia* 51:105-113.
- DIMITRI, F; ARCA, B; BERGHELLA, L; MEI, E; (1997) High genetic instability of heterochromatin alter transposition of the LINElike 1 factor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8052-8057.
- DINIZ, D; LAUDICINA, A; BERTOLLO LAC (2009) Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Gen Mol. Biol.* 32:37-41.
- DINIZ, D; LAUDICINA, A; CIOFFI, MB; BERTOLLO LAC (2008) Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 122:163-168.
- DONALD, TM; HOUBEN, A; LEACH, CR; TIMMIS, JN (1997) Ribosomal RNA genes specific to the B chromosomes in *Brachycome dichromosomatica* are not transcribed in leaf tissue. *Genome.* 40:674-681.
- DOURADO, OF (1981) Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Fortaleza, Convênio SUDENE/DNOCS 40p.
- DOVER, GA; RILEY, R (1972) Prevention of pairing of homoeologous meiotic chromosomes of wheat by an activity of supernumerary chromosomes of *Aegilops*. *Nature* 240:159-&.

- DROUIN, G; MUNIZ DE SÁ, M (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* 12:481–493.
- EICKBUSH, TH; FURANO, AV (2002) Fruit flies and human respond differently for retrotransposon. *Curr Open Genet Dev.* 12:669-674.
- EICKBUSH, DG; EICKBUSH, TH; WERREN, JH (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma* 101:575-583.
- ENKERLI, J; BHATT, G; COVERT, SF (1997) Nht1, a transposable element cloned from a dispensable chromosome in *Nectria haematococca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:742-749.
- EVANS, GM; DAVIES, EW (1985) The genetics of meiotic chromosome pairing in *Lolium temulentum* X *Lolium perenne* tetraploids. *Theoretical and Applied Genetics* 71:185-192.
- FELDBERG, E; BERTOLLO, LAC; ALMEIDA TOLEDO, LF; FORESTI, F; MOREIRA-FILHO, O; SANTO, AF (1987) Biological aspects of amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* 29:1-4.
- FENOCCHIO, AS; PASTORI, MC; RONCATI HA; MOREIRA-FILHO O; BERTOLLO LAC (2003) A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. *Caryologia* 56:197-204.
- FENOCCHIO, AS; BERTOLLO, LAC; TAKAHASHI, CS; CAMACHO, JPM (2000) B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biol.* 48:105-109.
- FENOCHIO, AS; BERTOLLO, LAC (1990) Supranumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81:193-198.

- FENOCHIO, AS; BERTOLLO, LAC (1988) A simple method for fresh – water fish lymphocyte culture. Braz. J. Genet. 11:847-852.
- FERRO, DAM; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. Genetica 119:147-153.
- FERRO, DAM; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. Genetica 110:55-62.
- FERREIRA, DC; PORTO-FORESTI, F; OLIVEIRA, C; FORESTI, F (2011a) Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. Mobile Genetic Elements 1:2, 112-117.
- FERREIRA, DC; OLIVEIRA, C; FORESTI, F (2011b) Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Cytogent. Genome Res. 132:64-70.
- FISCHER, C; BOUNEAU, L; COUTENCEAU, JP; WEISSENBAACH, J; VOLF, JN; OZOUF-COSTAZ, C (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. Gene 336:175-83.
- FLECKER, AS (1996) Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. Ecology 77:1845-1854.
- FONTENELE, O (1982) Contribuição para o conhecimento da biologia da Curimatã pacu, *Prochilodus argenteus* Spix in Spix & Agassiz (Pisces: Characidae, Prochilodontinae). Coletânea de Trabalhos Técnicos. (Pesca e Piscicultura. Ministério do Interior). DNOCS 215-231p.

- FORESTI, F (1998) Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supernumerários em peixes. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicas. Londrina, Paraná. p.A1.
- FORESTI, F; OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49:810-813.
- FORESTI, F; ALMEIDA-TOLEDO, LF; TOLEDO, AS (1989) Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107-114.
- FORESTI, F; ALMEIDA-TOLEDO, LF; TOLEDO-FILHO, SA (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31:137-144.
- FRANK, SA (2000) Polimorphism of attack and defense. *Trends in Ecology and Evolution* 15:167-171.
- FRANKS, TK; HOUBEN, A; LEACH, CR; TIMMIS, JN (1996) The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 105:223-230.
- FROESE, R; PAULY, D (2005) Fishbase, Versão 21. World wide web publication. Disponível em www.fishbase.org. Acessado em 20 de dezembro de 2011.
- GALETTI JR, PM (1998) Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.* 65:53-56.
- GÊISER, DM; ARNOLD, ML; TIMBERLAKE, WE (1996) Wild chromosomal variants in *Aspergillus nidulans*. *Curr.Genet.* 29:293-300.

- GODINHO, AL; KYNARD, B (2008) Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. *River Research and Application* doi:10.1002/rra.1180.
- GODINHO, HP (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicada à aquicultura: bases para o desenvolvimento de Tecnologia de Produção. *Rev. Bras. Reprod. Animal* 31:351-360.
- GODINHO, AL; POMPEU, PS (2003) A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. *In: Godinho AL. (Org). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas* 361-372p.
- GODOY, MP (1975) Peixes do Brasil: sub-ordem Characoidei; bacia do rio Mogi Guassu. Editora Franciscana, Piracicaba, São Paulo 4:629-847.
- GONZALEZ-SANCHEZ, M; CHIAVARINO, M; JIMENEZ, G; MANZANERO, S; ROSATO, M; PUERTAS, MJ (2004) The parasitic effects of rye B chromosomes might be beneficial in the long term. *Cytogenetic and Genome Res.* 106:386-393.
- GOULDING, M (1981) Man and fisheries on an Amazon frontier. Kluwer Academic Publishers 137p.
- GRAPHODATSKY AS; KUKEKOVA AV; YUDKIN DV; TRIFONOV VA; BEKLEMISHEVA VR; PERELMAN PL; GRAPHODATSKY DA; TRUT LN; YANG F; FERGUSON-SMITH MA; ACLAND GM; AGUIRRE GD (2005) The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res.* 13:113-122.
- GRAVENA, W; TERIBELE, R; GIULIANO-CAETANO, L; DIAS, AL (2007) Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández, Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brasil). *Braz. J. Biol.* 67: 905-908.

- GRAVES RA; MARZLUFF WF; GIEBELHAUS DH; SCHULTZ GA (1985)
Quantitative and qualitative change in histone gene expression during early mouse embryo development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5685-5689.
- GRAY, CT; THOMAS, SM (1985) Germination and B chromosomes in *Allium porrum* L. Journal of Plant Physiology 121:281-285.
- GREEN, DM (1990) Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. Genome 33:818-824.
- GUTKNECHT, J; SPERLICH, D; BACHMANN, L (1995) A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. Chromosoma 103:539-544.
- HAFEZ, T; LABAT, R; QUILLER, R (1978) Aneuploidie observes chez les population de gardons (*Rutilus rutilus* L.) et d'ablettes (*Alburnus alburnus* L.) de la regions Mii-Pyreness. Bull Soc Nat Toulouse 114:85-92.
- HAKANSSON, A (1948) Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. Hereditas 34:35-59.
- HAKANSSON, A (1945) Überzählige chromosome in einer rasse von *Godetia nutans*. Hiorth. Bot. Notiser 2:1-19.
- HAN, FP; GAO, Z; YU, WC; BIRCHLER, JA (2007) Minichromosome analysis of chromosome pairing, disjunction, and sister chromatid cohesion in maize. Plant Cell 19: 3853–3863.
- HANKELN, T; KEYL, HG; ROSS, R; SCHMIDT, ER (1993) Evolution of histone gene loci in chironomid midges. Genome 36: 852–862.
- HASHIMOTO, DT; FERGUSON-SMITH, MA; RENS, W; FORESTI, F; PORTO-FORESTI, F (2011) Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene

- Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) Cytogenetic and Gen. Res. 134:64-71.
- HASHIMOTO, DT; GONÇALVES, VR; BORTOLOZZI, J; FORESTI, F; PORTO-FORESTI, F (2008) First report of a B chromosome in population of the *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). Gen. Mol. Biol. 31: 275-278.
- HATANAKA, T; GALETTI JR., PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122: 239-244.
- HENNING, F; TRIFONOV, V; ALMEIDA-TOLEDO, LF (2008) Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. Genet. Mol. Biol. 31 (suppl): 279-283.
- HENRIQUES-GIL, N; CANO, M; SANTOS, JL (1989) Sex-dependent meiotic behavior of B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 62:217-221.
- HERRERA, JA; LÓPEZ-LEÓN, MD; CABRERO, J; SHAW, MW; CAMACHO, JPM (1996) Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 76:633-639.
- HEWITT, GM; EAST, TM; SHAW, MW (1987) Sperm dysfunction produced by B chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. Heredity 58:59-68.
- HEWITT, GM (1973) Variable transmission rates of a B chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.). Chromosoma 40:83-106.
- HILSDORF, AWS; MOREIRA, RG (2008) Piracema, por que os peixes migram? In Scientific American Brasil 79:76-80.
- HOLMES, DS; BOUGOURD, SM (1989) B chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. 1. Natural populations. Heredity 63:83-87.

- HOUBEN, A; DEMIDOV, D; GERNAND, D; MEISTER, A; LEACH, CR; SCHUBERT, I (2003) Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant Journal* 33:967-973.
- HOUBEN, A; VERLIN, D; LEACH, CR; TIMMIS, JN (2001) The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, 110:451-459.
- HOUBEN, A; LEACH, CR; TIMMIS, JN; VERLIN D (1997) A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma* 106:513-519.
- HOUBEN, A; KYNAST, RG; HEIM, U; HERMANN, H; JONES, RN; FORSTER, JW (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 105: 97-103.
- HOWELL, WM; BLACK, DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- IBAMA (2003) Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. Estatística de Pesca: grandes regiões e unidades da federação. 137p.
- IBGE (1988) Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da pesca. 9p.
- JACKSON, RC; NEWMARK, P (1960) Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 132:1316-1317.
- JAMILENA, M; GARRIDO-RAMOS, M; RUÍZ-REJÓN, M; RUÍZ-REJÓN, C; PARKER, JS (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104:113-120.

- JAMILENA, M; RUÍZ-REJÓN, C; RUÍZ-REJÓN, M (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. J. Cell. Sci. 107:703-708.
- JENKINS, G; JONES, RN (2004) B chromosomes in hybrids of temperate cereals and grasses. Cytogenetic and Genome Res. 106:314-319.
- JESUS, CM; GALETTI JR. PM; VALENTINI, SR; MOREIRA-FILHO, O (2003) Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genetica 118:25-32.
- JESUS, CM; MOREIRA-FILHO, O (2003) Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Caryologia 56: 281-287.
- JIMÉNEZ, G; MANZANERO, S; PUERTAS, MJ (2000) Relationship between pachytene synapsis, metaphase I associations and transmission of 2B and 4B chromosome in rye. Genome 43:232-239.
- JONES, RN; PASAKINSKIENE, I (2005) Genome conflict in the gramineae. New Phytologist 165: 391-410
- JONES, N; HOUBEN, A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? Trends in Plant Science 8:417-423.
- JONES, RN (1995) Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. New Phytol. 131: 411-434.
- JONES, RN (1991). B-Chromosome drive. Am. Nat. 137:430-442.
- JONES, RN (1985) Are B chromosomes selfish? In The evolution of genome size (ed.T. Cavalier-Smith), London:Wiley 397-425p.
- JONES, RN; REES, H (1982) B Chromosomes. New York: Academic Press.

- JORGE, LC; SANCHEZ, S; MOREIRA-FILHO, O (2011) Chromosomal Characterization of *Prochilodus lineatus* from Paraná River, Corrientes, Argentina. I. B Chromosomes and NOR Banding. *Cytologia* 76: 219-222.
- KAYANO, H (1971) Accumulation of B chromosomes in the germline of *Locusta migratoria*. *Heredity* 27:119-1123.
- KEYL, HG; HÄGELE, K (1971) B chromosome bei *Chironomus*. *Chromosoma* 36:403-417.
- KIDWELL, MG; LISCH, DR (2000) Transposable elements and host genome evolution, *Trends in Ecology and Evolution* 15:95-99.
- KIMURA, M; KAYANO, H (1961) Maintenance of supernumerary chromosome in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. *Genetics* 46:1699-&
- KOLOMIETS, OL; BORBIEV, TE; SAFRONOVA, LD; BORISOV YM; BOGDANOV YF (1988) Synaptonemal complex analysis of B-chromosome behavior in meiotic prophase I in the East Asiatic mouse *Apodemus peninsulae* (*Muridae Rodentia*). *Cytogenet. Cell Genet.* 48:183-187.
- KUWADA, Y (1915) Ueber die chromosomenzahl von *Zea mays*. L. *Bot Mag.* 29:83-89.
- LAMB, JC; MEYER, JM; CORCORAN, B; KATO, A; HAN, F; BIRCHLER, JA (2007) Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize. *Chromosome Research* 15:33-49.
- LANGDON, T; SEAGO, C; JONES, RN; OUGHAM, H; THOMAS, H; FORSTER, W; JENKINS, G (2000) De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154:869-884.

- LEACH, CR; DONALD, TM; FRANKS, TK; SPINIELLO, SS; HANRAHAN, CF; TIMMIS, JN (1995) Organization and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 103:708-714.
- LECLAIR, S; ANSAN-MELAYAH, D; ROUXEL, T; BALESDENT, M (1996) Meiotic behaviour of the minichromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Curr. Genet.* 30:541-548.
- LEE MR; ELDER, FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogen. Cell Genet.* 26:36-40.
- LEVAN, A; FREDGA, K; SANDBREG, AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- LEVIN, DA; PALESTIS, BG; JONES, RN; TRIVERS, R (2005) Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 59:962-969.
- LIPPMAN, Z; GENDREL, AV; BLACK, M; VAUGHN, MW; DEDHIA, N; McCOMBIE WR (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430:471-476.
- LONG EO; DAWID, JB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Ver. Biochem.* 49:727-764.
- LÓPEZ-LEÓN, MD; CABRERO, J; DZYUBENKO, VV; BUGROV, AG; KARAMYSHEVA, TV; RUBTSOV, NB; CAMACHO, JPM (2008) Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res.* 121:260-265.
- LÓPEZ-LÉON, MD; CABRERO, J; CAMACHO, JPM (1999) Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris* . *Chromosome. Research* 7:83-88.

- LÓPEZ-LEÓN, MD; VEVES N; SCHWARZACHER, JS; HESLOP-HARRISON, JS; (PAT), HEWITT, GM; CAMACHO, JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome. Research* 2:87-92.
- LÓPEZ-LEÓN, MD; CABRERO, J; CAMACHO, JPM (1993) Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 71:352-362.
- LÓPEZ-LEÓN, MD; CABRERO, J; CAMACHO, JPM; CANO, MI; SANTOS, JL (1992) A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* 46:529-539.
- LORETO, V; CABRERO, J; LÓPEZ-LEÓN, MD; CAMACHO, JPM; SOUZA, MJ (2008) Possible autosomal origin of macho B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research* 16: 233–241 (2008).
- LOZANO, R; REJON, CR; REJON, MR (1988). A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology* 66:335-338.
- LOWE-MCCONELL, R (1975) *Fish communities in tropical freshwaters*. New York, Longman. 337p.
- LUCCHINI, S; NARDI, I; BARSACCHI, G; BATISTONI, R; ANDRONICO, F (1993) Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36:762-773.
- LUDECKE, HJ; SENGER, G; CLAUSSEN, U; HORSTHEMKE, B (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338:348–350

- LUI, LR; BLANCO, DR; MARGARIDO, VP; MOREIRA-FILHO, O (2009) First description of B chromosome in the family Auchenipteridae *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco river basin (MG, Brazil). *Micron* 40:552–559.
- MAGO-LECCIA, FM (1972) Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), com uma sinops de la espécies de Venezuela. *Acta Biol.Venez.* 8:35-96.
- MAISTRO, LM; OLIVEIRA, C; FORESTI, F (2000) Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 108:119-125.
- MAISTRO, EL; FORESTI, F; OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, L (1992) Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87:101-106.
- MALUSZYNSKA, J; SCHWEIZER, D (1989) Ribosomal RNA genes in *Crepis capillaries* detected by non-radioactive *in situ* hybridization. *Heredity* 62:59-65.
- MARTINS, C (2007) Transposons In: E. Pisano; C. Ozouf-Costaz; F. Foresti; B. G. Kapoor. (Org.). 1 ed. Enfield, New Hampshire, Science Publisher, USA 421-453p.
- MARTINS, C; GALETTI JR, PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* 111:439–446.
- MARTINS, C; GALETTI JR, PM (1999) Chromosomal localization of 5S r DNA genes in *Leporinuns* Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363-367.

- MARTÍNEZ, JL; MORÁN, P; GARCIA-VÁZQUEZ, E; PENDÁS, AM (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). Cytogen Cell Genet. 73:149-152.
- McALLISTER, BF; WERREN, JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma 106:243-253.
- McALLISTER, BF (1995) Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Insect. Mol Biol. 4:253-262.
- McQUADE, LR; HILL, RJ; FRANCIS D (1994) B chromosome systems in the greater glider. *Petauroides volans* (Marsupialis, Pseudocheiridae) 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. Cytogenet Cell Genet. 66:115-161.
- MCVEAN, GT (1995) Fractional chromosome hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. BioEssays 17: 579-582.
- MELANDER Y (1950) Accessory chromosomes in animals especially in *Polycelis tenuis*. Hereditas 36:19-38.
- MENEZES, NA; BUCKUP, PA; FIGUEIREDO, JL (2003) Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo 159p.
- MESTRINER CA; GALETTI JR, PM; VALENTINI, SR; RUIZ, IRG; ABEL, LDS; MOREIRA-FILHO, O; CAMACHO, JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosomes. Heredity 85:1-9.
- MIAO, VP; COVERT, SF; VANETTEN, HD (1991a) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. Science 254:1773-1776.

- MIAO, VP; MATTHEWS, DE; VANETTEN, HD (1991b) Identification and chromosomal locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. Mol. Gen. Genet. 226:214-223.
- MILLER, DJ; HARRISON, PL; MAHONY, TJ; MCMILLAN, JP; MILES, A; ODORICO DM; TEN LOHUIS MR (1993) Nucleotide sequence of the histone gene cluster in the coral *Acropora formosa* (Cnidaria; Scleractinia): Features of histone gene structure and organization are common to diploblastic and triploblastic metazoans J. Mol. Evol. 37(3): 245-253.
- MILLER, DA; DEV, VG; TANTRAVASHI, R; MILLER, OJ (1976) Supression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Expl. Cell Res, 101: 235-243.
- MILLS, D; MCCLUSKEY, K (1990) Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. Mol. Plant-Microbe Int. 3:351-357.
- MONTOVANI, M; ABEL, LDS; MESTRINER, CA; MOREIRA-FILHO, O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotype evolution. Genetica 109:161-168.
- MORAES, VPO; CARNEIRO, JS; DIAS AL (2009) B chromosomes in four different population of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A comparative study of frequency and distribution. Folia biologica (Kraków) 57:3-4
- MORAES-NETO, A; SILVA, M; MOTOSO, DA; VICARI, MR; ALMEIDA, MC; COLLARES-PEREIRA, MJ; ARTONI, RF (2011) Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei:Siluriforme). Neotropical Ichthyology 9:97-105.

- MORAN, P; MARTINEZ, JL; GARCIA-VÁSQUEZ, E; PENDÁS, AM (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cytogenet. Cell Genet. 75:145-150
- MOREIRA-FILHO, O; FENOCCHIO, AS; PASTORI, MC; BERTOLLO, LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Cytologia 66:59-64.
- MOTA, SQ; RUFFINO, ML (1997) Biologia e pesca do curimatá (*Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829) (Prochilodontidae) no médio Amazonas. Revista UNIMAR 19:493–508.
- MUÑOZ-PAJARES, AJ; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, L; TERUEL, M; CABRERO, J; CAMACHO, JPM; PERFECTI, F (2011) A Single, Recent Origin of the Accessory B Chromosome of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Genetics 187: 853–863.
- MÜNTZING, AS (1954) Cytogenetics of accessory chromosomes (B-chromosomes). Caryologia 6:282-301.
- MÜNTZING, A (1948) Accessory chromosomes in *Poa alpina*. Heredity 2:49-61.
- MÜNTZING, A (1944) Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye I. Isofragments produced by misdivision. Hereditas 30:231-248.
- NELSON, JS (2006) Fishes of the World. 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 601 p.
- NÉO, DM; BERTOLLO, LAC; MOREIRA-FILHO, O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosome in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Genetica 108:211-215.

- NOLETO, RB; GUIMARÃES, FSF; PALUDO, KS; VICARI, MR; ARTONI, RF; CESTARI, MM (2007) Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Mar Biotechnol* 11:680–685.
- NUR, U; BRETT, BLH (1988) Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma* 96:205-212.
- NUR, U; BRETT, BLH (1987) Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis (obscurus)*. *Genetics* 115:499-510.
- NUR, U (1977) Maintenance of a “parasitic” B chromosome in the grasshopper *Melonoplus femur-rubrum*. *Genetics* 87:499-512.
- NUR, U (1969) Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 27:1-19.
- NUR, U (1966a) Harmful B chromosomes in a mealy bug population. *Genetics* 54: 1225-1238.
- NUR, U (1966b) The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. *Genetics* 54:1239-1249.
- OLIVEIRA, LN; CABRAL-DE-MELLO, DC; ROCHA, MF; LORETO, V; MARTINS, C; MOURA, RC (2011) Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics* 4:24.
- OLIVEIRA, C; FORESTI, F; HILSDORF AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*. 35:81–100.

- OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, LF; FORESTI, F (2007) Karyotypic Evolution em *In Neotropical Fishes*. (Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C; Foresti, F; Kapoor, B.G. Eds) Fish Citogenetics. Science Publishers USA 111-152p.
- OLIVEIRA, C; NIRCHIO, M; GRANADO, A; LEVY, S (2003a) Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus Kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei:Prochilodontidae from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology* 1:47-52.
- OLIVEIRA, C; SABOYA, SMR; FORESTI, F; SENHORINI, JA; BERNARDINO, G (1997) Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity* 79:473-476.
- OLIVEIRA, C; FORESTI, F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76: 183-186.
- OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, LF; FORESTI, F; TOLEDO-FILHO, SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41:227-236.
- ÖSTERGREN, G (1947) Heterochromatic B chromosomes in *Anthoxanthum*. *Hereditas* 33:261-296
- ÖSTERGREN, G (1945) Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot. Notiser* 2:157-163.
- OZOUF-COSTAZ C, BRANDT, J; KORTING, C; PISANO, E; BONILHO C; COUTANCEAU, JP (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16:51-7.

- PAGE, BT; WANOUS, MK; BIRCHLER, JA (2001) Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: Evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. *Genetics* 159:291-302.
- PAIVA, MP (1983) Peixes e pesca de águas interiores do Brasil. Brasília: Editerra Editorial. 158p.
- PALIWAL, RL; HYDE, BB (1959) The association of a single B chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *American Journal of Botany* 46:460-466.
- PARDO, MC; LÓPEZ-LEÓN, MD; HEWITT, GM; CAMACHO, JPM (1995) Female fitness is increased by frequent mating in grasshoppers. *Heredity* 74:654-660.
- PARDO, MC; LÓPEZ-LEÓN, MD; CABRERO, J; CAMACHO, JPM (1994) Transmission analysis of mitotically unstable B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Genome* 37:1027-1034.
- PARKER, JS; TAYLOR, S; AINSWORTH, CC (1982) The B chromosome system of *Hypochoeris maculata*. III. Variation in B chromosome transmission rates. *Chromosoma* 85:229-310.
- PAULS, E; BERTOLLO, LAC (1990) Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of cariotipic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 81:117-123.
- PAULS, E; BERTOLLO, LAC (1983) Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36: 307-314.
- PENDÁS, AM; MORÁN, P; FREIJE, JP; GARCIA-VÁSQUEZ, E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.* 67:31-36.

- PEPPERS, JA; WIGGINS, LE; BAKER, RJ (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Chromosome Research 5:475-479.
- PERFECTTI, F; CORRAL, JM; MESA JA (2004) Rapid supresión of drive for a parasitic B chromosome. Cytogenetic Genome Res. 106:338-343
- PERFECTTI, F; WERREN, JH (2001) The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. Evolution 55:1069-1073.
- PETERS, GB (1981) Germ line polysomy in the grasshopper *Atractomorpha similis*. Chromosoma 81:593-617.
- PETRERE, JR. M (1989) River fisheries in Brazil: a review. Regul. Rivers: Res. Mgmt. 4:1-16.
- PINEAU, P; HENRY, M; SUSPÈNE, R; MARCHIO, A; DETTAI, A; DEBRUYNE, R; PETIT, T; LÉCU, A; MOISSON, P; DEJEAN, A; WAIN-HOBSON, S; VARTANIAN, JP (2005) A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. Mol Biol Evol. 22:582–588.
- PINKEL, D; STRAUME, T; GRAY, JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83:2934–2938.
- PLOWMAN, AB; BOUGOURD, SM (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. Heredity 72:587-593.
- POHLER, W; SCHLEGEL, R (1990) A rye plant with frequent A-B chromosome pairing. Hereditas 112:217-220.

- POLETO, AB; FERREIRA, IA; MARTINS, C (2010) The B chromosome of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbor 18S rRNA gene copies. BMC Genetics 11:1-8.
- PORTO-FORESTI, F. (2001) Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento. Instituto de Biociências de Botucatu. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Botucatu 119 p.
- PORTO-FORESTI, F; OLIVEIRA, C; MAISTRO, EL; FORESTI, F (1997) Estimated frequency of B-chromosome and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in small stream. Brazil. J. Genet. 20:377-380.
- PUERTAS, MJ (2002) Nature and evolution of chromosome in plants: a non-cod but information-rich part of plant genomes. Cytogenet. Genome Res 96:198-205.
- RA' B, P; RA' BOVA', M; PEREIRA, CS; COLLARES-PEREIRA, MJ; PELIKA'NOVA', S (2008) Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker V the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by crossspecies painting. Chromosome Research 16:863–873.
- RAGHUVANSHI, SS; KUMAR, G (1983) No male sterility gene on B chromosomes in *Plantago coronopus*. Heredity 51:429-&.
- RANZ, JM; GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A (2003) LOW OCCURRENCE of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila* . Evolution 57: 1325–1335 (2003
- REIS, RE; KULLANDER, SO; FERRARIS JR. (2003) Check list of the Freshwater Fishes of South América. Edipucrs, Porto Alegre 729p.

- RIMPAU, J; FLAVELL, RB (1975) Characterization of rye B chromosome DNA by DNADNA hybridization. *Chromosoma* 52:207-217.
- ROTHFELS, KH (1950) Chromosome complement, polyploidy and supernumeraries in *Neopodismopsis abdominalis*. *Chromosomes Today* 1:28-30.
- SANTOS, JI; DEL CERRO, AL; FRENÁNDEZ, A; DÍEZ, M (1993) Meiotic behavior of B chromosome in the grasshopper *Omocestus burri*: A case of drive in female. *Hereditas* 118:139-143.
- SALVADOR, LB; MOREIRA-FILHO, O (1992) B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69:50-56.
- SANDERY, MJ; FORSTER, JW; BLUNDEN, R; JONES, RN (1990) Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* 33:908-913.
- SAPRE, AB; DESHPANDE, DS (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.* 78:191-196.
- SCHAEFER, SA (1998) Conflict and resolution impact of a new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricaridae). *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, LR; Malabarba, RE; Reis, RP; Vari, ZMS. 375-400 p.
- SCHARTL, M; NANDA, I; SCHLUPP, I; WILDE, B; EPPLER, JT; SCHMIDT, M; PARZEFALL, J (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373:68-71.
- SCHUBERT, I; WOBUS, U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing region in *Allium*. *Chromosoma* 92:143-148.
- SHARBEL, TE; PIJNACKER, LP; BEUKEBOOM, LW (1997) Multiple supernumerary chromosomes in the pseudogamous parthenogenetic flatworm, *Polycelis nigra*: lineage markers or remnants of genetic leakage? *Genome* 40:850-856.

- SHAW, MW; HEWITT, GM (1985) The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 54:259-268.
- SHAW, MW; HEWITT, GM; ANDERSON, DA (1985) Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 55:61-68.
- SHAW, MW; HEWITT, GM (1990) B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next? In *Oxford surveys in evolutionary biology* (ed. D. Futuyma & J. Antonovics), Oxford University Press 7:197-223
- SHI, I; TANG, L; MA, K; MA, C (1988) Synaptonemal complex formation among supernumerary B chromosomes an electron microscopic study on spermatocytes of Chinese raccoon dogs. *Chromosoma (Berl.)* 97:178-183.
- SILVA, AS (2002) Regime hidrológico e comportamento morfo-hidráulico do Rio Araguaia. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá.
- SIVASUNDAR, A; BERMINGHAM, E; ORTÍ, G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10:407-417.
- STARK, EA; CONNERTON, I; BENNETT, ST; BARNES, SR; PARKER, JS; FORSTER, JW (1996) Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research* 4:15-23.
- STEVENS, NM (1908) The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. *J. Exp. Zool.* 5:453-470.

- STITOU, S; DE LA GAURDIA, RD; JIMÉNEZ R; BURGOS, M (2000) Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosome of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae) implications for their origin and evolution. *Chrom. Research* 8:305-311.
- SUMNER, AT (1972) Chromosome Banding. Unwin Hyman Inc. Cambridge 434p.
- SUZUKI, H; SAKURAI, S; MATSUDA, Y (1996) Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.* 72:1-4.
- SWITONSKY, M; GUSTAVSSON, I; HOJER, K; PLOEN, I (1987) Synaptonemical complex of the B chromosome in spermatocytes of the silver fox (*Culpes fulvus* *Desm. f*) *Cytogenet. Cell Genet.* 45:84-92.
- SZAUTER, P (1984) An análisis of regional constraints on Exchange in *Drosophila melanogaster* using recombination-defective meiotic mutants. *Genetics* 106:45-71.
- SZCZERBAL, I; SWITONSKI, M (2003) B chromosome of the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. *Caryologia* 56:213-216.
- TALAVERA, M; LÓPEZ-LÉON, MD; CABRERO, J; CAMACHO, JPM (1990) Male germ line polysomy in the grasshopper *Chorthippus binotatus*: extra chromosome are not transmitted. *Genome* 33:384-388.
- TAYLOR, AI (1967) Patau's, Edwards' and cri du chat syndromes: A tabulated summary of current findings. *Develop. Med.Child Neurol.* 9:78.
- TELENIUS, H; CARTER, NP; BEBB, CE; NORDENSKYOLD, M; PONDER, BA; TUNNACLIFFE, J (1992) Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general

- amplification of target DNA by a single degenerated primer. *Genomics* 8:718-725.
- TERUEL, M; CABRERO, J; PERFECTTI; CAMACHO, JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217-225.
- TERUEL, M; CABRERO, J; MONTIEL, EM; ACOSTA, MJ; SÁNCHEZ,S; CAMACHO, JPM (2009a) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research* 17:11-18.
- TIMMIS, JN; INGLE, J; SINCLAIR, J; JONES, RN (1975) Genomic quality of rye B chromosomes. *J Exp Bot* 26, 367-&.
- TERUEL, M; CABRERO, J; PERFECTTI, F; ACOSTA, MJ; SÁNCHEZ, S; CAMACHO, JPM (2009b) Microdissection and B chromosome painting of X and B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet. Genome Res.*125:186-291.
- THEURI, J; PHELPS-DURR, T; MATHEWS, S; BIRCHLER, J (2005) A comparative study of retrotransposons in the centromeric regions of A and B chromosomes of maize. *Cytogenetic and Genome Res.* 110:203-208.
- THOMA, F; KOLLER, T; KLUG, A (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin *J. Cell Biol.* 83:403-427.
- TRIPPUTI, P; EMANUEL, BS; CROCE, CM; GREEN, LG; STEIN, GS; STEIN, JL (1986) Human histone genes map to multiple chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3185–3188.
- TRIVERS, R; BURT, R; PALESTIS, BG (2004) B chromosome and genome size in flowering plants. *Genome* 47:1-8.

- TURNER, PC; BAGENAL, EB; VLAD, MT; WOODLAND, HR (1988) The organization and expression of histone genes from *Xenopus borealis*. Nucl Acids Res 16: 3471–3485
- TZENG, TH, LYNGHOLM, LK, FORD, CF; BRONSON, CR (1992) A restriction fragment length polymorphism and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Genetics 130:81-96.
- VARI, RP (1983) Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). Smithsonian Contributions to Zoology 378:1-60.
- VARI, RP; MALABARBA, LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP et al (eds) Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre.
- VENERE, PC; MIYAZAWA, CS; GALETTI JR. PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. Genet Mol Biol. 22: 345-349.
- VICARI, MR; PISTUNE, HFM; CASTRO, JP; ALMEIDA, MC; BERTOLLO, LAC; MOREIRA-FILHO, O; CAMACHO, JPM; ARTONI RF (2011) New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. Genetica 139:1073-1081.
- VICARI, MR; ALMEIDA, MC; BERTOLLO, LAC; MOREIRA-FILHO, O; ARTONI RF (2006). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes Prochilodontidae). Genet. and Mol. Biol. 29:621-625.

- VICARI, MR; ARTONI, RF; BERTOLLO, LAC (2005) Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basis. Genet Mol Biol. 28:103-110.
- VICENTE, VE; JESUS, CM; MOREIRA-FILHO, O (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). Caryologia 4:365-369.
- VICENTE, VE; MOREIRA-FILHO, O; CAMACHO, JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). Cytogenetic Cell Genet. 74:70-75.
- VOLFF, JN; BOUNEAU, L; OZOUF-COSTAZ, C; FISCHER, C (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. Trends Genet. 19: 674–678.
- VOLOBUJEV, VT (1981) The B-chromosome system of mammals. Caryologia 34:1-23.
- VOLTOLIN, TA; SENHORINI, JA; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F; (2011) Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Gen. and Mol. Biol. 34:220-224.
- VOLTOLIN, TA; SENHORINI, JA; OLIVEIRA, O; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F (2010a) Supernumerary chromosome inheritance in curimatá (*Prochilodus lineatus*) Mogi-Guaçu river. Hereditas 147: 127–131.
- VOLTOLIN, TA; SENHORINI, JA; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F (2010b) B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 138:1133–1139.

- VOLTOLIN, TA; LAUDICINA, A; SENHORINI, JA; OLIVEIRA, O; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F (2010c) Origin and molecular organization of supernumerary chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiforme, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica* 138:1133–1139.
- VOLTOLIN, TA; SENHORINI, JA; OLIVEIRA, O; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F (2009) Cytogenetic Markers in Wild Population of Curimatá(*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. *Cytologia* 74: 281–287.
- VUJOSEVIC, M; BLAGOJEVIC, J (2004) B chromosomes in populations of mammals. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:247-256.
- WASKO, AP; MARTINS, C; WRIGHT, JM; GALETTI JR. PM (2001) Molecular organization of 5S rRNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44:839-902.
- WELCOME, RL (1979) Fisheries Ecology of Foodplain Rivers. Longman, Inc., New York.
- WERREN, JH (1991) The Paternal sex ratio chromosome of *Nasonia*. *American Naturalist* 137:392-402.
- WHITE, TJ; BRUNST, LS; TAYLOR, J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego 315–322
- WHITE, MJD (1973) Animal cytology and Evolution Third edition, Cambridge University Press: London 961p.
- WILSON, E (1907) The supernumerary chromosome of Hemiptera. *Science* 26:870-871.

- YUDKIN, DV; TRIFONOV, VA; KUKEKOVA, AV; VOROBIEVA, NV; RUBTSOVA, NV; YANG, F; ACLAND, GM; FERGSON-SMITH, MA; GRAPHODATSKY, AS (2007) Mapping of KIT adjacent sequence on canid autosomes and B chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 116:100-103.
- ZEYL, CW; GREEN, DM (1992) Heteromorphism for a highly repeated sequence in the New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. *Evolution* 46:1891-1899.
- ZHANG, L; BAO, Z; WANG, S; HUANG, X; HU, J (2007) Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia:Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica* 130: 193–198.
- ZHOU RN, HU ZM (2007) The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its application in genomic research. *Curr. Genomics* 8:67–72
- ZIEGLER, CG; LAMATSCH, DK; STEINLEIN, C; ENGEL, W; SCHARTL, M; SCHIMID, M (2003) The giant B chromosome of the *cyprinid* fish *Alburnus alburnus* a retrotransposons-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res.* 11:23-35.
- ZILMA, J; PIALEK, J; MACHOLAN, M (2003) Possible heterotic effects of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. *Canadian Journal of Zoology*
- ZURITA, S; CABRERO, J; LÓPEZ-LEÓN, MD; CAMACHO, JPM (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52:274-277.