

**Cristiano Neves do Nascimento**



**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA E NOVAS OCORRÊNCIAS DE CROMOSSOMOS  
SUPRANUMERÁRIOS EM *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (CHARACIFORMES:  
CHARACIDAE)**

**Mestrado**

**BOTUCATU, SP  
2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA E NOVAS OCORRÊNCIAS DE CROMOSSOMOS  
SUPRANUMERÁRIOS EM *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (CHARACIFORMES:  
CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Cristiano Neves do Nascimento**

**Orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves**

**BOTUCATU, SP**  
**2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Nascimento, Cristiano Neves do.

Descrição cariotípica e novas ocorrências de cromossomos supranumerários em *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) / Cristiano Neves do Nascimento. - Botucatu, 2015

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

Orientador: José Carlos Pansonato Alves

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Mapeamento Cromossômico. 3. DNA. 4. Ictiofauna. 5. Characidae.

Palavras-chave: DNA Repetitivo; Famílias Multigênicas; Mapeamento Cromossômico .

### **A Deus...**

- ✓ *Meus pais Eunice, Manoel, meu padrasto Gerson, minha irmã Tatiane e meus sobrinhos Carlos Gabriel e Angeline, por terem me acompanhado nesta jornada, sempre oferecendo palavras de otimismo e de fé.*

*...amo muito vocês!*

## Agradecimentos

Primeiro a Deus, pelo dom da vida, por minha família e amigos. Gostaria de agradecer também todas as pessoas e instituições que de forma direta ou indireta colaboram para o desenvolvimento deste trabalho. Em particular gostaria de agradecer também:

- ✓ Ao professor José Carlos Pansonato Alves, pela valiosa orientação, incentivo, amizade, confiança e apoio recebidos ao longo da realização desse trabalho;
- ✓ Aos professores Fausto Foresti e Cláudio de Oliveira, pela motivação e exemplos como pesquisadores e dedicação ao trabalho;
- ✓ Ao professor Waldo Pinheiro Troy pela disponibilização de seu tempo para as coletas dos espécimes, pelas sugestões e discussões que foram extremamente fundamentais na execução deste trabalho e também pela amizade;
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Ictiologia e Citogenética Animal (UNEMAT), pela ajuda nas coletas, nas atividades do laboratório e principalmente pela amizade e companheirismo;
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial aos amigos do laboratório de citogenética, Cristian, Érica, Maria Lígia, Priscila, Ricardo e Viviane, que ao longo desses dois anos tiveram muita paciência e dedicação;
- ✓ Ao técnico Renato Devidé sempre presente e disposto a ajudar, pelos trabalhos empenhados neste projeto, ensinamentos e amizade;
- ✓ A todos os professores do programa Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do IBB/UNESP, pela dedicação e por todos os seus ensinamentos;
- ✓ Aos funcionários do Departamento de Morfologia e da seção técnica de Pós-Graduação que, através do seu trabalho, permitiram que este estudo fosse realizado;
- ✓ As instituições de fomento FAPESP, CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste projeto e pela concessão da bolsa de mestrado;
- ✓ A minha noiva Tayomara, pelo carinho, amor, compartilhando comigo cada instante e sentimentos vividos durante esta fase;
- ✓ Aos meus pais, pela educação e o amor dedicado a mim, em especial à minha mãe Eunice, pelo exemplo de vida, confiança incentivo incondicional e por todo esforço dedicado na minha formação pessoal, educacional e profissional, fundamentais para a conclusão desta importante etapa em minha vida.

E a todos que, por ventura, eu não tenha mencionado, mas que certamente merecem todos os meus agradecimentos.

*A realização desta Dissertação Só foi possível pela **colaboração de todos** Vocês!*

**Muito OBRIGADO!**

## Resumo

O mapeamento cromossômico de sítios de DNA repetitivo vem sendo realizado em vários estudos citogenéticos em peixes e tem permitido uma melhor caracterização da biodiversidade e evolução genômica da ictiofauna Neotropical. Dentre as diversas espécies de peixes distribuídas nesta importante área geográfica, podemos destacar o gênero *Moenkhausia*, um dos mais especiosos grupos de peixes da família Characidae. Do ponto de vista citogenético, este gênero demonstra variação do número diploide de 48 a 50 cromossomos, bem como a presença de microcromossomos B descritos para diferentes espécies/populações. No entanto, estudos citogenéticos de espécies de *Moenkhausia* coletadas em riachos de cabeceira da bacia Amazônica e bacia do Alto rio Paraguai ainda são incipientes, bem como os estudos relativos à distribuição de DNAs repetitivos nos genomas de diferentes espécies de *Moenkhausia*. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização cariotípica de *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp. coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia Amazônica e bacia do Alto rio Paraguai. Todas as espécies foram analisadas através de técnicas citogenéticas clássicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela impregnação por Nitrato de Prata e bandamento C) e molecular (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S, histona H1, snDNA U2 e sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub>). Todas as espécies/populações analisadas apresentaram 2n=50 cromossomos, porém com fórmulas cariotípicas distintas entre elas. O bandamento C revelou um padrão de bandas heterocromáticas similar entre essas espécies, exceto em *M. cf. nigromarginata*. A impregnação por Nitrato de Prata evidenciou Ag-RONS simples em todas as espécies analisadas. A FISH utilizando o DNAr 18S como sonda confirmou os resultados obtidos com o Nitrato de Prata e revelou sítios adicionais apenas na espécie *M. oligolepis*. O DNAr 5S foi localizado em sítios múltiplos em todas as espécies, ocupando, geralmente, uma posição intersticial nos cromossomos. Notavelmente, ambos os sítios ribossômicos estão em

sintenia em uma única população de *M. oligolepis*. Em todas as espécies/populações analisadas a histona H1 mostrou-se co-localizada em apenas um par cromossômico com o DNAr 18S. O mapeamento cromossômico de snDNA U2 revelou a ocorrência de sítios múltiplos em todas as espécies de *Moenkhausia* analisadas. Adicionalmente, em *M. cf. nigromarginata*, estas sequências foram observadas em sintenia com o DNAr 5S. Deve-se destacar que cromossomos supranumerários foram observados nas espécies *M. cf. forestii* e em *M. oligolepis*. Em *M. cf. forestii* uma frequência de 0-3 microcromossomos B foi observada. Além disso, as três populações de *M. oligolepis* amostradas apresentaram cromossomos B morfológicamente distintos entre si, sendo observados microcromossomos B ( $B_{micro}$ ), cromossomos B metacêntricos ( $B_m$ ) e cromossomos B acrocêntricos ( $B_{ac}$ ). A frequência destes cromossomos extras foi variável, tanto no nível inter como intra-individual. Os cromossomos B, observados nessas duas espécies de *Moenkhausia* apresentaram distintos padrões de heterocromatina, sendo possível observar cromossomos B eucromáticos e totalmente/parcialmente heterocromáticos. As hibridações com sondas de DNAs repetitivos revelou sinais de histona H1, DNAr 18S e snDNA U2, em diferentes cromossomos B. Finalmente, os resultados obtidos aqui permitirão uma melhor investigação sobre a extensão da ocorrência destes cromossomos neste gênero, bem como ampliam os dados de DNAs repetitivos em cromossomos B.

## Abstract

The cytogenetic mapping of repetitive DNA has been applied in several studies in fish, which allowed a better characterization about the biodiversity and genomic evolution of Neotropical ichthyofauna. Among the several fish species living in this area, the genus *Moenkhausia*, one of the specious groups inside Characidae, is remarkable. From a cytogenetic point of view, this genus show variations in diploid numbers of 48 to 50 chromosomes, as well as the occurrence of B chromosomes in different species/populations. However, cytogenetic studies in *Moenkhausia* collected at different rivers from the Amazon and Upper Paraguay River basins are scarce, as well as studies investigating the chromosomal distribution of repetitive DNAs in different species. In this sense, the present study aimed to characterize the karyotypes of *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* and *Moenkhausia* sp. collected at different sites in the Amazon and Upper Paraguay River basins. All species were analyzed using classical (conventional staining with Giemsa, localization of NORs by impregnation with Silver nitrate and C-banding) and molecular (fluorescent in situ hybridization with 5S and 18S rDNA, H1 histone, U2 snDNA and telomeric sequences (TTAGGG)<sub>n</sub> probes). All the herein analyzed species showed 2n=50 chromosomes, with different karyotype formulas. C-banding evidenced similar patterns of heterochromatin distribution in all species, except in *M. cf. nigromarginata*. Silver nitrate staining evidenced simple Ag-NORs in all species and FISH with 18S rDNA probes confirmed these results e revealed additional sites in *M. oligolepis*. The 5S rDNA was interstitially located in multiple sites in all species. Notably, both ribosomal sites were found in synteny in one population of *M. oligolepis*. The H1 histone sites were co-located in a single pair with 18S rDNA and the U2 snDNA was located at multiple sites in all species. Additionally, the U2 snDNA was co-located with the 5S rDNA in *M. cf. nigromarginata*. Supernumerary chromosomes were found in the species *M. cf. forestii* and *M. oligolepis*. In the first species, a frequency of 0-3 micro-

chromosomes was observed. Besides that, the three populations of *M. oligolepis* showed distinct B chromosomes, like micro-chromosomes ( $B_{\text{micro}}$ ), metacentric B chromosomes ( $B_{\text{m}}$ ) and acrocentric B chromosomes ( $B_{\text{ac}}$ ). The frequency of each variant was variable in the inter- and intra-specific levels. Notably, these B chromosomes showed distinct patterns of C-banding, with euchromatic and totally/partially heterochromatic B chromosomes. Finally, FISH experiments revealed signals of H1 histone, 18S rDNA and U2 snDNA in the different B chromosomes. Results obtained here will allow a better investigation about the extension of B chromosomes in this genus, as well as, expand the data about repetitive DNAs allocated in B chromosomes.

## Sumário

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Citogenética de peixes Neotropicais: caracterização da biodiversidade e evolução da ictiofauna .....                                   | 1         |
| 1.2      | Cromossomos B em peixes.....   | 3         |
| 1.3      | O gênero <i>Moenkhausia</i> : características taxonômicas e citogenéticas .....  | 5         |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>6</b>  |
| 2.1      | Objetivo Geral .....   | 6         |
| 2.2      | Objetivos Específicos .....  | 7         |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>8</b>  |
| 3.1      | Local de coleta e amostragem.....  | 8         |
| 3.2      | Metodologia .....  | 10        |
| 3.2.1    | Estimulação mitótica .....   | 10        |
| 3.2.2    | Obtenção de cromossomos mitóticos .....  | 11        |
| 3.2.3    | Preparo de lâminas .....   | 12        |
| 3.2.4    | Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....   | 12        |
| 3.2.5    | Detecção da Heterocromatina Constitutiva (banda C).....  | 13        |
| 3.2.6    | Extração de DNA genômico.....  | 14        |
| 3.2.7    | Preparação das sondas de DNA para FISH.....  | 14        |
| 3.2.8    | Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....  | 18        |
| 3.2.9    | Análise dos dados e montagem dos cariótipos.....   | 20        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>5</b> | <b>CAPÍTULO 1:.....</b>  | <b>22</b> |
|          | <b>DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA E NOVAS OCORRÊNCIAS DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM <i>Moenkhausia</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) ....</b> | <b>22</b> |
| <b>6</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>45</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Citogenética de peixes Neotropicais: caracterização da biodiversidade e evolução da ictiofauna

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos devido à utilização de técnicas mais resolutivas de análise, o que tem possibilitado à citogenética contribuir efetivamente não apenas para estudos taxonômicos, como também para maior compreensão da biologia cromossômica como um todo. Estes avanços também se refletem nos estudos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos. Na região Neotropical já foram analisadas citogeneticamente cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 espécies da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem a superordem Ostariophysi revisão em (Oliveira *et al.*, 2007). Este levantamento aponta ainda a ocorrência de cromossomos sexuais em 62 espécies, sendo 40 espécies com heterogametia feminina e 22 espécies com heterogametia masculina, bem como a ocorrência de cromossomos supranumerários em mais de 60 espécies de peixes (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, esses dados são ainda incipientes se considerarmos que podem existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nessa região biogeográfica (Reis *et al.*, 2003).

A aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de bandamento C e bandas de endonucleases de restrição, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons e a identificação de cromossomos supranumerários e sexuais (Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Nos últimos anos, o desenvolvimento de sondas específicas de DNA possibilitou a hibridização destes marcadores em cromossomos metafásicos, através da técnica

denominada FISH (*Fluorescent in situ hybridization*). Este método é uma ferramenta interessante e permite correlacionar informações moleculares com a localização física de segmentos específicos nos cromossomos. Na última década, o mapeamento cromossômico de sítios de DNA repetitivo vem sendo utilizado com sucesso nos estudos citogenéticos em peixes, permitindo melhor caracterização da biodiversidade e evolução da ictiofauna (Martins 2007; Vicari *et al.*, 2010), além de contribuir para a determinação das relações filogenéticas, como realizado em cariomorfos do complexo de espécies *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2009) e entre espécies do gênero *Astyanax* (Hashimoto *et al.*, 2011). Ainda, também permite uma primeira abordagem de investigação sobre a organização destas sequências nos genomas de diferentes organismos, como demonstrado nos gêneros *Gymnotus* (Scacchetti *et al.*, 2012) e *Leporinus* (Martins e Galetti 2001) que apresentam duas classes distintas de DNAr 5S em diferentes cromossomos; e nos diversos casos de sintonia entre classes distintas de DNA repetitivo e as consequências evolutivas e funcionais desta condição, como DNAr e elementos transponíveis (TEs) (Mandrioli *et al.*, 2000; Mandrioli e Manicardi 2001; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013), DNAr 5S e DNAr 18S (Almeida-Toledo *et al.*, 2002), DNAr e DNArhis (Hashimoto *et al.*, 2012a; Pansonato-Alves *et al.*, 2013) e DNAs satélites (DNAsat) e 18S (Vicari *et al.*, 2008). Estudos como estes revelam características sobre a organização estrutural de determinadas sequências repetitivas e sua dinâmica no genoma dos organismos, revelando a importância do DNA repetitivo na evolução dos genomas eucarióticos.

Embora um pouco mais restritos, devido à sua ocorrência reduzida, os estudos citogenéticos voltados à análise sistemática de cromossomos B, ou supranumerários, também vêm aumentando nos últimos anos à medida que novas variantes são caracterizadas em distintas espécies/populações. Particularmente, estes estudos são interessantes devido à natureza pouco conhecida destes elementos.

## 1.2 Cromossomos B em peixes

Cromossomos supranumerários são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão A (Bougourd e Jones 1997). Sua ocorrência e distribuição são conhecidas para grande conjunto de organismos, como fungos, plantas e animais (Navas-Castillo *et al.*, 1986; Alfenito e Birchler 1993; Covert 1998). Dentre suas principais características, se destacam: (i) são elementos dispensáveis, não sendo necessários para os processos fundamentais de crescimento e desenvolvimento; (ii) não se pareiam ou recombinaem com cromossomos do complemento padrão A durante a meiose; (iii) se comportam de forma irregular durante a mitose e/ou meiose (Bougourd e Jones 1997; Camacho *et al.*, 2000). O estudo sistematizado destes elementos genômicos inclui investigações sobre a estrutura, origem, transmissão, dinâmica populacional, evolução e até a interação destes cromossomos com os do conjunto genômico A (Camacho *et al.*, 2000; Bugrov *et al.*, 2007).

De forma geral, os cromossomos B são compostos principalmente por DNAs repetitivos, sequências caracterizadas por uma ampla dinâmica em relação à organização genômica (Charlesworth *et al.*, 1994) e incluem DNAs satélites, DNA centromérico e telomérico, DNA ribossômico (DNAr) e sítios histônicos (DNAHis), além de elementos móveis que, frequentemente são encontrados nos elementos supranumerários de uma variedade elevada de organismos (Camacho 2005). No entanto, sequências codificantes também já foram encontradas nestes cromossomos (Miao *et al.*, 1991; Graphodatsky *et al.*, 2005; Teruel *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2014), podendo, inclusive, estarem ativas (Ruiz-Estévez *et al.*, 2012; Trifonov *et al.*, 2013).

Pela abundância de sequências repetitivas nestes cromossomos, diversos autores focaram no estudo desta fração genômica visando melhor caracterização da composição de cromossomos B. Para investigar a origem de um cromossomo B presente em uma espécie de

gafanhoto, por exemplo, López-León *et al.*, (1994) utilizaram a técnica de FISH com sondas de genes ribossômicos e de um DNA satélite isolado do genoma da espécie *Eyprepocnemis plorans*. Os resultados obtidos apontaram para origem intraespecífica a partir do cromossomo X desta espécie, uma vez que os padrões de hibridação das sequências mapeadas eram semelhantes nos cromossomos X e B. Por outro lado, em uma espécie de vespa nomeada *Nasonia vitripennis* foi possível verificar que a origem dos cromossomos supranumerários existentes estaria, provavelmente, relacionada a um evento interespecífico (McAllister e Werren 1997), principalmente após os autores verificarem que algumas sequências repetitivas presentes nos supranumerários desta espécie eram mais relacionadas a outras espécies do que a ela mesma.

O advento, no início dos anos 90 (Deng *et al.*, 1992; Meltzer *et al.*, 1992), da técnica de microdissecção cromossômica, que se baseia na extração seletiva de fragmentos ou cromossomos inteiros, permitiu uma abordagem mais direta sobre a estrutura e composição molecular destes elementos genômicos. Até o momento, a utilização destes cromossomos como sonda em experimentos de pintura cromossômica é o método mais empregado em estudos evolutivos, com resultados obtidos em organismos das mais distintas ordens (McQuade *et al.*, 1994; Sharbel *et al.*, 1998; Trifonov *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2008; Teruel *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Estudando a origem de cromossomos supranumerários na espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, Voltolin *et al.*, (2010), verificaram, por meio de pintura cromossômica, que as sequências presentes nestes cromossomos não apresentavam qualquer homologia com o conjunto A do genoma desta espécie, indicando possível origem interespecífica. Além de auxiliar no entendimento sobre a origem destes cromossomos, os experimentos de pintura também podem ser realizados entre diferentes espécies, utilizando sondas provenientes de organismos distintos, esta variação é conhecida como pintura cromossômica *cross-species* e pode fornecer informações sobre a homologia de

cromossomos similares presentes em linhagens distintas (Ried *et al.*, 1998; Rens *et al.*, 2006; Henning *et al.*, 2008). Finalmente, métodos que permitam acessar o conteúdo nucleotídico propriamente dito destes cromossomos podem resultar em análises evolutivas mais significativas. Nesse sentido, a utilização do material genético proveniente de cromossomos B microdissecados para a amplificação de determinadas sequências, ou mesmo o sequenciamento completo, permite abordagens distintas de estudo, como a comparação contra sequências genômicas em nível intra e interespecíficas e a verificação do grau de degeneração destas sequências. Assim, inferências sobre o tipo de origem destes elementos supranumerários, bem como tempo do surgimento e suas possíveis funções podem ser realizadas (Teruel *et al.*, 2010; Pansonato-Alves *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Valente *et al.*, 2014).

### 1.3 O gênero *Moenkhausia*: características taxonômicas e citogenéticas

*Moenkhausia* é um dos gêneros mais especiosos que compõem a família Characidae, sendo composto por mais de 70 espécies amplamente distribuídas pela região Neotropical (Lima *et al.*, 2003). Este gênero foi proposto por Eigenmann 1903 e seu nome foi em homenagem ao Dr William J. Moenkhaus, da Universidade de Indiana, EUA. No entanto, uma descrição mais detalhada foi apresentada pelo próprio Eigenmann em 1917, definindo que as espécies agrupadas no gênero *Moenkhausia* compartilham duas fileiras de dentes pré-maxilares, com cinco ou mais dentes na fileira interna do pré-maxilar, linha lateral (geralmente) completa e a base da nadadeira caudal recoberta por escamas. Essas características morfológicas são utilizadas até os dias atuais para a diagnose e inclusão de novas espécies neste gênero. No entanto, espécies que não se enquadram a esta definição tradicional são descritas e também podem ser alocadas no gênero *Moenkhausia* com base na semelhança com algumas espécies do gênero (Benine *et al.*, 2009; Zanata *et al.*, 2009; Bertaco *et al.*, 2011; Pastana e Dagosta 2014).

Por outro lado, análises filogenéticas utilizando caracteres morfológicos e/ou moleculares em *Moenkhausia* não demonstram a monofilia do grupo (Mirande 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Mariguela *et al.*, 2013), evidenciando que a taxonomia deste gênero é bastante complexa e necessita de uma melhor avaliação (Benine *et al.*, 2009; Mariguela *et al.*, 2013).

Estudos citogenéticos realizados em uma pequena fração de espécies deste gênero evidenciaram algumas características particulares deste grupo de peixes. Embora apresente uma macroestrutura cariotípica aparentemente conservada com maior frequência de  $2n=50$  cromossomos, variações na distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e distintos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva já foram observados. Além disso, a ocorrência de distintas variantes de cromossomos supranumerários também é uma característica notável e é alvo de estudos frequentes (Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro *et al.*, 2001; Portela-Castro e Júlio-Júnior 2002; Dantas *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2012b).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho se insere no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu), visando aumentar o conhecimento sobre a estrutura molecular de cromossomos supranumerários e os mecanismos moleculares que norteiam a sua evolução. Nesse sentido, a caracterização cariotípica das espécies *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp. coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia Amazônica e bacia do Alto rio Paraguai foi realizada.

## 2.2 Objetivos Específicos

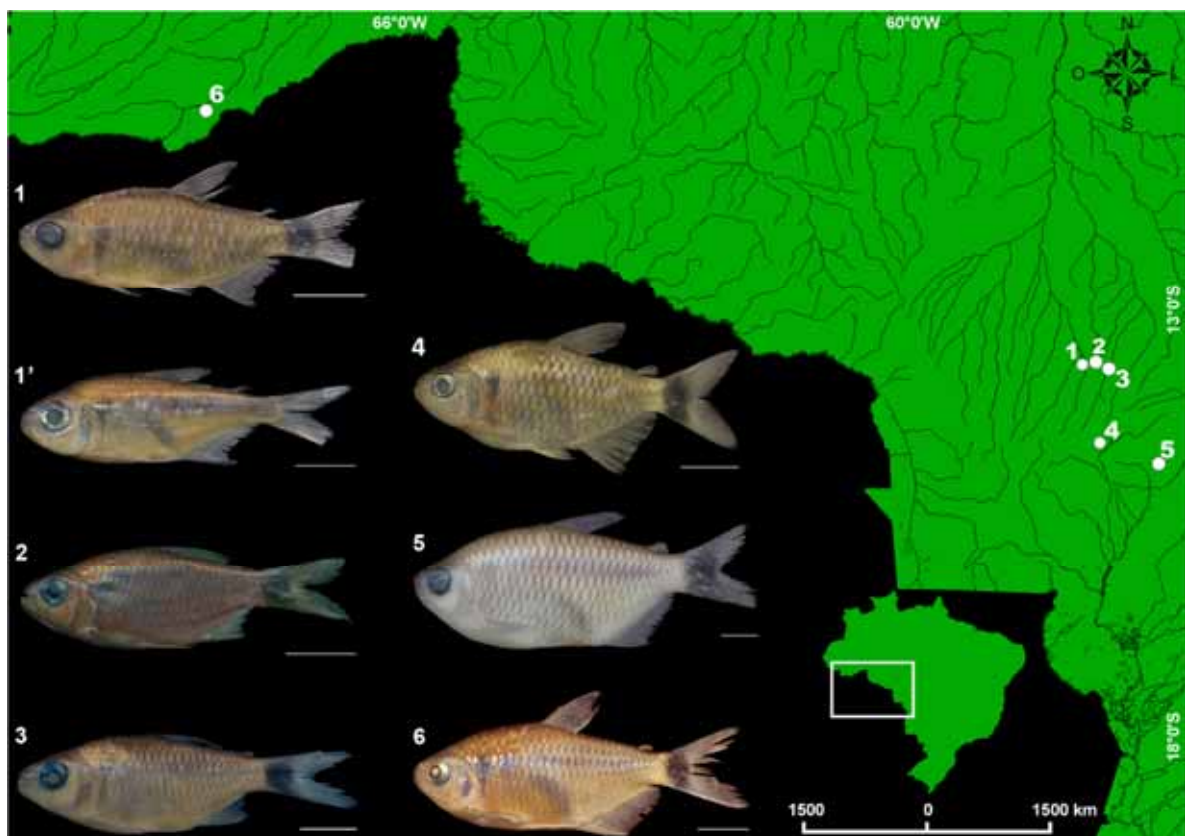
O presente trabalho tem como objetivos específicos investigar e analisar o cariótipo e aprofundar os estudos citogenéticos através do mapeamento de sequências de DNAs repetitivos em espécies e populações de *Moenkhausia* provenientes de diferentes componentes hidrográficos brasileiros, com a finalidade de:

- a) Ampliar o conhecimento citogenético sobre este grupo de peixes, estabelecendo e comparando a estrutura cariotípica das cinco espécies coletadas em tributários da bacia Amazônica e do Alto rio Paraguai;
- b) Caracterizar distintas variantes de cromossomos B presentes nas células dos indivíduos analisados;
- c) Realizar o mapeamento citogenético de diferentes classes de DNAs repetitivos, incluindo sequências ribossômicas e histônicas, além dos genes para *Small Nuclear RNA*, nos cromossomos das cinco espécies de *Moenkhausia*, bem como investigar a presença destes DNAs nos cromossomos B das espécies que apresentam tais cromossomos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de coleta e amostragem

Foram analisadas citogeneticamente cinco espécies de peixes do gênero *Moenkhausia* (*M. cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp.) coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia Amazônica e da bacia do Alto rio Paraguai, das regiões norte e centro-oeste do Brasil (**Figura 1**). A espécie *M. oligolepis* teve três populações analisadas e *M. nigromarginata* apenas duas populações, enquanto as demais espécies tiveram uma única população analisada cada (**Tabela 1**).



**Figura 1** – Mapa da área de coleta das espécies e/ou populações de *Moenkhausia*: **ponto 1** Rio Verde (*M. cosmops* e *M. cf. nigromarginata*); **ponto 2** Rio Membeca (*Moenkhausia* sp. e *M. cf. nigromarginata*); **ponto 3** Rio do Sangue (*M. oligolepis*); **ponto 4** Ribeirão do Sapo (*M. cf. forestii*); **ponto 5** Córrego Corredeira (*M. oligolepis*); **ponto 6** Córrego Sem Nome (*M. oligolepis*). A barra equivale a 1 cm.

Os exemplares coletados foram transportados e acondicionados em sacos plásticos, utilizando a água dos próprios pontos de coleta. Em laboratório, os peixes coletados foram aclimatados em aquários aerados e lá permaneceram até serem analisados. Os espécimes foram coletados de acordo com os procedimentos recomendados pela legislação brasileira de proteção ambiental (Coleção Permissão MMA/IBAMA/SISBIO – número 3245), bem como a amostragem, manutenção e análise das amostras foram realizadas de acordo com os protocolos internacionais de experimentação animal, seguido pela Universidade Estadual Paulista – UNESP. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA com protocolo (CEUA/IBB/UNESP - número 504). Os espécimes utilizados foram fixados em formol 10 %, conservados em álcool 70 % e, após identificação, os mesmos foram depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Espécimes de *Moenkhausia* coletados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP; F: fêmeas; M: macho.

| Espécies                     | Coordenadas                  | Localidade/Município                        | LBP   | Nº Amostral |   |
|------------------------------|------------------------------|---|-------|-------------|---|
|                              |                              |   |       | M           | F |
| <i>Moenkhausia cosmops</i>   | 13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W | Rio Verde –<br>Campo Novo do Parecis/MT     | 8164  | 2           | 2 |
| <i>M. cf. forestii</i>       | 14°33'24.43"S, 57°48'45.53"W | Ribeirão do Sapo –<br>Tangará da Serra/MT   | 19532 | 4           | 8 |
| <i>M. oligolepis</i>         | 14°48'08.33"S, 57°07'25.18"W | Córrego Corredeira –<br>Denise/MT           | 19530 | 4           | 4 |
|                              | 13°41'30.56"S, 57°42'23.28"W | Rio do Sangue –<br>Campo Novo do Parecis/MT | 8527  | 3           | 4 |
|                              | 10°40'03.63"S, 68°15'43.61"W | Córrego Sem Nome –<br>Xapuri/AC             | 18576 | 3           | 2 |
| <i>M. cf. nigromarginata</i> | 13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W | Rio Verde –<br>Campo Novo do Parecis/MT     | 19533 | 1           | 2 |
|                              | 13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W | Rio Membeca –<br>Campo Novo do Parecis/MT   | 8525  | 1           | 0 |
| <i>Moenkhausia</i><br>sp.    | 13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W | Campo Novo do Parecis/MT                    | 19531 | 4           | 1 |

## 3.2 Metodologia

As técnicas citogenéticas desenvolvidas envolveram a estimulação mitótica, proposta por Cole e Levans (1971) e a técnica de preparação direta de cromossomos em peixes utilizando células renais, proposta por Foresti *et al.*, (1981). Para visualização dos cromossomos mitóticos empregou-se a coloração convencional por Giemsa a 5% e análise em microscópio óptico Olympus BX41. A detecção das RONS foi realizada através da técnica de impregnação por Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) proposta por Howell e Black (1980). A heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela técnica de bandamento C, descrita por Sumner (1972). A localização cromossômica de DNAs repetitivos foi realizada através da técnica de FISH, estabelecida por Pinkel *et al.*, (1986). A organização do cariótipo seguiu a ordenação dos cromossomos de forma decrescente ao tamanho, arranjados por tipos morfológicos originalmente proposto por Levan *et al.*, (1964).

### 3.2.1 Estimulação mitótica

Com o objetivo de obter uma maior frequência de células em divisão mitótica nas preparações, os animais foram submetidos à injeção prévia de solução de fermento biológico, conforme descrito por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Bertollo *et al.*, (1978) e Oliveira *et al.*, (1988) para peixes. O procedimento utilizado consistiu em:

- 1) Preparar uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 mL de água destilada;
- 2) Incubar a solução em uma estufa a 37 °C por cerca de 10 minutos;
- 3) Injetar a solução na região dorso-lateral do peixe na proporção de 1 mL por 100 g de peso do animal;
- 4) Deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado por cerca de 48 horas antes de sacrificar.

### 3.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica proposta por (Foresti *et al.*, 1981), com algumas adaptações. Esta metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão por solução de Cloreto de Potássio (KCl) e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético.

O procedimento utilizado consistiu:

- 1) Injetar na região intra-abdominal uma solução aquosa de colchicina a 0,0125% na proporção de aproximadamente 1 mL / 100 g de peso do animal;
- 2) Manter o peixe em aquário bem aerado por um período de 40 minutos;
- 3) Sacrificar o animal, retirando a porção anterior e posterior do rim e transferir o material para uma placa de Petri contendo 7 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M);
- 4) Dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação e uma seringa hipodérmica de vidro, desprovida de agulha, até a obtenção de uma solução homogênea;
- 5) Transferir a suspensão de células obtida para um tubo de centrífuga e deixá-la no interior de uma estufa a 37 °C por 21 minutos;
- 6) Retirar da estufa, colocando 10 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;
- 7) Adicionar cerca de 8 mL de fixador e novamente agitar a mistura, levar à centrífuga a 1000 rpm por 10 minutos;
- 8) Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 mL de fixador; centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm;
- 9) Repetir o passo anterior por 2 vezes.

Após a última lavagem, com fixador, descartar o sobrenadante e diluir o precipitado em aproximadamente 1 mL de fixador e transferir para tubos de microcentrífuga tipo *Eppendorff* de 1,5 mL e armazenar em geladeira a ~ 4°C.

### 3.2.3 Preparo de lâminas

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram transferidos, do tubo tipo *Eppendorff*, cerca de 1 a 2 gotas de suspensão para diferentes regiões de uma lâmina previamente limpa. Em seguida o material contido na lâmina foi corado com solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH = 6,7) por 8 minutos.

### 3.2.4 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

Para identificar as RONs foi utilizada a técnica de impregnação por Nitrato de Prata descrita por Howell e Black (1980), com algumas adaptações. Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo proteico nas regiões organizadoras de nucléolos. O procedimento envolveu o uso de duas soluções:

- **Solução A** (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina dissolvida em 50 mL de água destilada. Adiciona-se 0,5 mL de ácido fórmico.
- **Solução B** (solução de Nitrato de Prata): 1 g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 mL de água destilada. Com estas soluções procedeu-se da seguinte maneira:
  - 1) Hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60 °C;
  - 2) Lavar em água destilada e secar a lâmina;
  - 3) Misturar em um tubo tipo *Eppendorf* três gotas da solução A e seis gotas da solução B com o auxílio de pipetas Pasteur;

- 4) Pingar 6 gotas da mistura sobre a lâmina e cobrir com uma lamínula;
- 5) Depositar a lâmina em um suporte no interior de um banho-maria a 65 °C com a lamínula voltada para baixo. Em aproximadamente 2 minutos a lâmina torna-se marrom-dourada.
- 6) Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar.
- 7) Corar com solução de Giemsa 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por 10 segundos;
- 8) Lavar o material da lâmina e deixar secar ao ar.

### 3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita originalmente por (Sumner 1972). Esta técnica baseia-se na ação sequencial de tratamentos com soluções ácida, básica e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, revelando as regiões de heterocromatina, que se encontram mais compactadas e sofre menor ação dos tratamentos. O procedimento consistiu em:

- 1) Secar as lâminas recém pingadas ao ar por uma noite;
- 2) Hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2 N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
- 3) Passar por solução de hidróxido de Bário ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) 5 % a 60 °C por cerca de 15 segundos e lavar em água destilada;
- 4) Lavar em HCl 1 N a 60 °C e, em seguida, em água destilada;
- 5) Incubar por 30 minutos em 2xSSC (pH = 6,8) a 60 °C;
- 6) Corar por 8 minutos com solução de Giemsa a 5 % em tampão Fosfato (pH = 6,7);
- 7) Lavar e deixar secar ao ar.

### 3.2.6 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado ou músculo preservado em etanol 95 %, utilizando-se o Kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), conforme instruções do fabricante.

### 3.2.7 Preparação das sondas de DNA para FISH

A amplificação de sequências para os DNAr 5S e 18S, telomérica, histonas H1 snDNA foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de espécimes de *M. cf. forestii* e *M. sp.*, utilizando *primers* conforme a Tabela 2.

**Tabela 2** – Relação dos *primers* utilizados nas amplificações por PCR.

|            | Região | Primer | Direção da Sequência (5' → 3')          | Referência                       |
|------------|--------|--------|---|----------------------------------|
| Histona    | H1     | H1F    | forward:<br>ATGGCAGAARYCGMCCAG          | Hashimoto <i>et al.</i> , (2011) |
|            |        | H1R    | reverse:<br>TACTTCTTCTTGGGSGCTGC        |                                  |
| DNAr       | 18S    | 18SF   | forward:<br>GTAGTCATATGCTTGTCTC         | White <i>et al.</i> , (1990)     |
|            |        | 18SR   | reverse:<br>TCCGCAGGTTACCTACGGA         |                                  |
|            | 5S     | 5SF    | forward:<br>TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC  | Pendas <i>et al.</i> , (1994)    |
|            |        | 5SR    | reverse:<br>TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA |                                  |
| snDNA      | U2     | U2F    | forward:<br>ATCGCTTCTCGGCCTTATG         | Bueno <i>et al.</i> , (2013)     |
|            |        | U2R    | reverse:<br>TCCCGGCGGTACTGCAATA         |                                  |
| Telomérica | Tel    | TelF   | forward:<br>(TTAGGG) <sub>n</sub>       | Ijdo <i>et al.</i> , (1991)      |
|            |        | TelR   | reverse:<br>(CCCTAA) <sub>n</sub>       |                                  |

### 3.2.7.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR a partir do DNA total de *M. cf. forestii*, usando os *primers* 18S descritos na tabela 2. Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (*Roche Applied Science*) por PCR. A detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e os parâmetros para marcação foram: 34,5 µL de água Mili-Q, 5 µL de tampão da enzima Taq polimerase (10 X), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µL de dTTP (2 mM cada), 1,3 µL de Biotina-16-dUTP, 1 µL de cada primer (10 mM), 0,5 µL de Taq polimerase (5U / µL) e 1 µL de DNA molde. Total da reação: 50 µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 95 °C ---- 5 min          |             |
| 95 °C ---- 45 seg         | } 30 ciclos |
| 52 °C ---- 45 seg         |             |
| 72 °C ---- 1 min e 30 seg |             |
| 72 °C ---- 5 min          |             |
| 12 °C ---- manutenção     |             |

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR a partir do DNA total de *Moenkhausia* sp., usando os *primers* 5S descrito na tabela 2. Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (*Roche Applied Science*) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (*Roche Applied Science*). Os parâmetros para marcação foram: 35 µL de água Mili-Q, 5 µL de tampão da enzima Taq polimerase (10 X), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µL de dTTP (2 mM cada), 0,8 µL de Digoxigenina-11-dUTP, 1 µL de cada primer (10mM), 0,5 µL de Taq polimerase (5U / µL) e 2 µL de DNA molde. Total da reação: 50 µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95 °C ---- 5 min  
95 °C ---- 1 seg  
55 °C ---- 45 seg  
72 °C ---- 1 min  
72 °C ---- 7 min  
12 °C ---- manutenção

} 30 ciclos

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1,5%.

### 3.2.7.2 Preparação da sonda para Histona H1

A sonda de H1 foi obtida por PCR a partir do DNA total de *M. cf. forestii*, usando os *primers* de H1 descrito na tabela 2. Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (*Roche Applied Science*) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (*Roche Applied Science*). Os parâmetros para marcação foram: 35 µL de água Mili-Q, 5 µL de tampão da enzima Taq polimerase (10 X), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µL de dTTP (2 mM cada), 0,8 µL de Digoxigenina-11-dUTP, 1 µL de cada primer (10 mM), 0,5 µL de Taq polimerase (5U / µL) e 1 µL de DNA molde. Total da reação: 50 µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95 °C ---- 5 min  
95 °C ---- 30 seg  
54 °C ---- 45 seg  
72 °C ---- 1 min  
72 °C ---- 7 min  
12°C ---- manutenção

} 30 ciclos

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1,5 %.

### 3.2.7.3 Preparação da sonda de snRNA U2

A sonda de snRNA U2 foi obtida por PCR a partir do DNA total de *M. cf. forestii*, usando os *primers* descrito na tabela 2. Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (*Roche Applied Science*) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (*Roche Applied Science*). Os parâmetros para marcação foram: 35,2 µL de água Mili-Q, 5 µL de tampão da enzima Taq polimerase (10 X), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µL de dTTP (2 mM cada), 0,6 µL de Digoxigenina-11-dUTP, 1 µL de cada primer (10mM), 0,5 µL de Taq polimerase (5U / µL) e 1 µL de DNA molde. Total da reação: 50 µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 94 °C ---- 5 min      | } 30 ciclos |
| 94 °C ---- 30 seg     |             |
| 52 °C ---- 30 seg     |             |
| 72 °C ---- 45 min     |             |
| 72 °C ---- 7 min      |             |
| 12 °C ---- manutenção |             |

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1,5 %.

### 3.2.7.4 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi obtida por PCR a partir do DNA total de *M. sp.*, usando os *primers* de telômero indicado na tabela 2. Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (*Roche Applied Science*) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (*Roche Applied Science*). Os

parâmetros para marcação foram: 37  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q, 5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima Taq polimerase (10 X), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dATP, dCTP e dGTP e 0,7  $\mu\text{L}$  de dTTP (2 mM cada), 0,6  $\mu\text{L}$  de Digoxigenina-11-dUTP, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada primer (10 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase (5U /  $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde. Total da reação: 53,30  $\mu\text{L}$ .

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 95 °C ---- 10 min     | } 30 ciclos |
| 95 °C ---- 45 seg     |             |
| 52 °C ---- 45 seg     |             |
| 72 °C ---- 1 min      |             |
| 72 °C ---- 5 min      |             |
| 12 °C ---- manutenção |             |

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1,5 %.

### 3.2.8 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O mapeamento das sondas em cromossomos metafásicos foi realizado com a utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por (Pinkel *et al.*, 1986), com modificações conforme descrito a seguir:

#### Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1X por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70 %, 80 % e 100 % a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100  $\mu\text{g}$  / mL) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C, em seguida lavadas 2 vezes em 2xSSC por 5 minutos e uma

vez em PBS 1X por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005 % / HCl 10 mM por 10 minutos a 37 °C, em seguida lavadas em PBS 1X à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1 % / PBS 1X / MgCl<sub>2</sub> 50 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1X por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70 %, 80 % e 100 % a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho. Após a secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70 % a 70 °C por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70 %, 80 % e 100 % a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10 % sulfato dextrano, 50 % formamida e 20xSSC e água) contendo 2 µL de sonda marcada por 10 minutos a 95 °C. Posteriormente, 30 µL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37 °C *overnight*.

## **Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes**

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15 % / 0,2xSSC a 42 °C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60 °C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5 % / 4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó e 4xSSC) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5 % / 4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 100 µL de solução de bloqueio com anticorpo (100 µL de solução de bloqueio e 0,5 µL de antidigoxirodamina mais 1 µL de avidina conjugada com FITC) por 1 hora em câmara úmida e no escuro a 37 °C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5 % / 4xSSC por 5 minutos, desidratadas

em série de etanol 70 %, 80 % e 100 % a 20 °C negativos por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 15 µL de Vectashield *Mounting Medium* com DAPI (Vector).

### 3.2.9 Análise dos dados e montagem dos cariótipos

As preparações cromossômicas convencionais e a FISH foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) com objetiva de imersão de 100 vezes, buscando estabelecer o número diploide modal para os espécimes de *Moenkhausia* coletados. As melhores metáfases ou as que apresentaram melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas com o auxílio do programa *Image Pro Plus*, 6.0 (MediaCybernetics). As preparações obtidas com fluorocromos foram capturadas separadamente (utilizando filtros UV específicos).

Com o subsídio do software Adobe Photoshop, os cromossomos foram isolados e arranjados de acordo com seu tamanho e sua morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) segundo critérios estabelecidos por Levan *et al.*, (1964). Posteriormente foram emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho em cada classe, para a disposição final do cariótipo.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As informações obtidas dos estudos citogenéticos clássicos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Moenkhausia* foram organizadas na forma de um capítulo, com o objetivo de facilitar a delimitação das informações para posterior publicação.

As referências utilizadas até o presente momento e no capítulo a seguir encontram-se relacionadas no final desta dissertação.

## 5 CAPÍTULO 1:

### DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA E NOVAS OCORRÊNCIAS DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM *Moenkhausia* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

**Palavras-chave:** *Moenkhausia*, famílias multigênicas, mapeamento cromossômico, DNA repetitivo.

## Resumo

No presente trabalho, estudos citogenéticos foram realizados nas espécies *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp. coletadas em diferentes rios e riachos das bacias Amazônica e do rio Paraguai. As análises cariotípicas envolveram técnicas citogenéticas clássicas e moleculares (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S, histona H1, snDNA U2 e teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub>). Todas as espécies/populações analisadas apresentaram 2n=50 cromossomos, com variações interespecíficas nas fórmulas cariotípicas. O bandamento-C, revelou um padrão de bandas heterocromáticas similar entre essas espécies, exceto em *M. cf. nigromarginata*. As RONS, identificadas pela coloração com Nitrato de Prata e pela sonda de DNAr 18S mostraram-se simples, exceto em uma população de *M. oligolepis*. Os sítios de DNAr 5S estão distribuídos em múltiplos cromossomos em todas as espécies, ocupando, geralmente, uma posição intersticial nos cromossomos. Além disso, em uma população de *M. oligolepis* os genes ribossômicos 5S e 18S estão em sentença. Sítios simples e múltiplos de histona H1 foram observados em todas as espécies/populações analisadas e a histona H1 mostrou-se co-localizada com o DNAr 18S em um único par cromossômico. O mapeamento físico de snDNA U2 evidenciou sítios múltiplos em todas as espécies de *Moenkhausia*. Além disso, em *M. cf. nigromarginata* estas sequências foram observadas em sentença com o DNAr 5S. Cromossomos B foram observados em *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*. Em *M. cf. forestii* foi observado uma frequência de 0-3 microcromossomos, enquanto as três populações de *M. oligolepis* apresentaram cromossomos B morfologicamente distintos entre si, sendo observados microcromossomos B (B<sub>micro</sub>), cromossomos B metacêntricos (B<sub>m</sub>) e cromossomos B acrocêntricos (B<sub>ac</sub>). A frequência desses cromossomos extras mostrou-se variável, tanto no nível inter como intra-individual. Os cromossomos B observados nestas duas espécies de *Moenkhausia* apresentaram distintos padrões de heterocromatina, sendo evidenciados cromossomos B eucromáticos e totalmente/parcialmente heterocromáticos. Sinais fluorescentes revelados pela FISH, utilizando sondas de H1, DNAr 18S e snDNA U2, também foram observados nos cromossomos B destas espécies. Desta forma, os marcadores clássicos e moleculares utilizados no presente trabalho apresentaram-se como uma boa ferramenta para identificação da variação citogenética presente em *Moenkhausia*, possibilitando um melhor conhecimento sobre a evolução cariotípica, bem como a ocorrência de cromossomos B nesse gênero.

## Introdução

*Moenkhausia* Eigenmann 1903 é um dos mais especiosos grupos de peixes da família Characidae, sendo composto por mais de 70 espécies com ampla distribuição em rios e riachos da região Neotropical. Neste grupo, a maior diversidade pode ser encontrada em corpos d'água da bacia Amazônica e Guianas (Lima *et al.*, 2003). Embora não seja considerado um grupo monofilético, *Moenkhausia* apresenta alguns caracteres diagnósticos como, presença de linha lateral completa e/ou incompleta; duas fileiras de dentes no pré-maxilar e presença de escamas cobrindo a base dos lobos da nadadeira caudal (Eigenmann 1917). Devido à sua ampla distribuição geográfica e diversidade morfológica, espécies de *Moenkhausia* representam um interessante grupo para estudos filogenéticos (Benine *et al.*, 2009; Mirande 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Mariguela *et al.*, 2013), taxonômicos (Benine *et al.*, 2007; Benine *et al.*, 2009; Marinho e Langeani 2010; Pastana e Dagosta 2014), ontogênicos (Walter 2011) e citogenéticos (Portela *et al.*, 1988; Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro *et al.*, 2001; Dantas *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2012b).

Estudos citogenéticos realizados em representantes do gênero *Moenkhausia* têm demonstrado que as espécies deste grupo apresentam número diploides relativamente conservados, variando de  $2n=48$  à  $2n=50$  cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Portela-Castro e Júlio-Júnior 2002; Dantas *et al.*, 2007). Apesar desta aparente conservação cariotípica, variações relativas à distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e à localização de blocos heterocromáticos podem ser observadas em níveis intra e interpopulacionais (Portela *et al.*, 1988; Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro *et al.*, 2001; Dantas *et al.*, 2007). Além disso, as espécies *M. intermedia* e *M. sanctaefilomenae* também apresentam cromossomos B em suas células. Notavelmente, estes elementos supranumerários podem variar em relação à sua morfologia, distribuição e até

mesmo estarem restritos a apenas 1 dos sexos, como observado em uma população de *M. sanctaefilomenae* (Portela *et al.*, 1988; Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro e Júlio-Júnior 2002; Dantas *et al.*, 2007).

De forma geral, cromossomos supranumerários já foram encontrados em mais de 60 espécies de peixes Neotropicais (Carvalho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009). Embora o conhecimento sobre a composição, função ou origem destes cromossomos ainda seja incipiente, diversos estudos têm revelado sequências repetitivas alocadas nestes elementos, permitindo a elaboração de hipóteses sobre os prováveis cromossomos ancestrais dos cromossomos B em diferentes organismos (Mestriner *et al.*, 2000; Artoni *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

Apesar da diversidade cariotípica reportada em *Moenkhausia*, deve-se destacar que a maioria dos dados obtidos até o momento são restritos a poucas espécies, evidenciando a necessidade de caracterizar outras espécies deste gênero, visando agregar novas informações cariotípicas, localização cromossômica de DNAs repetitivos, distribuição da heterocromatina constitutiva, bem como a ocorrência de cromossomos B. Nesse sentido, análises citogenéticas clássicas e moleculares foram realizadas nas espécies *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata* e *M. sp.* coletadas em riachos de cabeceira da bacia Amazônica e da bacia do Alto rio Paraguai. Além disso, novas ocorrências de cromossomos B em *Moenkhausia cf. forestii* e *M. oligolepis* também foram reportadas. A dinâmica evolutiva de sequências repetitivas, bem como hipóteses sobre a origem e evolução de cromossomos B são discutidas.

## Material e Métodos

### *Locais de coleta e Análise Citogenética*

Foram analisadas cinco espécies de *Moenkhausia* coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia Amazônica e da bacia do Alto rio Paraguai (**Figura 2**) nos Estados do Acre e Mato Grosso, Brasil (**Tabela 1**). As amostras foram coletadas de acordo com os procedimentos recomendados pela Legislação Brasileira de Proteção Ambiental (Coleção Permissão MMA/IBAMA/SISBIO - número 3245), bem como a amostragem, manutenção e análise das amostras foram realizadas de acordo com os protocolos internacionais sobre a experimentação animal, seguido pela Universidade Estadual Paulista (Protocolo CEUA/IBB/UNESP - número 504). Os espécimes foram identificados e depositados na coleção do Laboratório de Biologia Peixes de Botucatu - LBP, São Paulo, Brasil (**Tabela 1**).

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica proposta por Foresti *et al.*, (1981). Os cromossomos metafásicos foram analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas com câmera digital Olympus DP70. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.*, (1964) e os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados em ordem decrescente de tamanho na montagem dos cariótipos. A marcação das RONS pelo Nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

*Amplificação dos DNAs repetitivos e Hibridação in situ Fluorescente – FISH*

A amplificação das sequências de DNAr 5S e 18S, teloméricas, histona H1 e snDNA U2 foi realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de espécimes de *M. cf. forestii* e *Moenkhausia* sp., utilizando os *primers* conforme a Tabela 2. As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP ou biotina-16-dUTP (Roche) em reações de PCR secundárias.

O mapeamento físico das sequências repetitivas foi realizado através da FISH utilizando o método descrito em Pinkel *et al.*, (1986). A detecção dos sinais fluorescentes foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche) para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotilada (Sigma) para as sondas marcadas com biotina-16-dUTP. Após a detecção, os cromossomos foram contra-corados com DAPI. O material analisado foi fotografado utilizando fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX61) e as imagens capturadas com câmera digital Olympus DP70.

**Resultados**

As análises cariotípicas realizadas em exemplares de *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp. evidenciaram um número diploide de 50 cromossomos para todas as espécies analisadas (**Figura 3 e 4**), com variações nas fórmulas cariotípicas (**Tabela 3**). Polimorfismos cromossômicos relacionados ao sexo não foram detectados em nenhuma espécie.

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva apresentou-se similar entre *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp., sendo observados blocos heterocromáticos em região centromérica e/ou pericentromérica na maioria dos

cromossomos (**Figura 3 e 4**). No entanto, *M. cf. nigromarginata* apresentou um padrão heterocromático bem distinto, com pequenos blocos centroméricos nos cromossomos acrocêntricos e em região terminal de alguns poucos cromossomos (**Figura 3c'**).

Com a impregnação do Nitrato de Prata para visualização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), observamos sítios simples na região terminal do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico e/ou subtelocêntrico em todas as espécies/populações (**Figura 3 e 4**).

Cada espécie/população analisada citogeneticamente apresentou características particulares, quanto a localização e distribuição dos sítios de DNAr 5S. Em *M. cosmops* tal sítio foi mapeado em posição pericentromérica dos pares cromossômicos 1 e 2 (**Figura 5a**). Em *M. cf. nigromarginata*, do Rio Membeca, *clusters* de DNAr 5S, foram observados em posição centromérica dos pares acrocêntricos 24 e 25, porém os espécimes do Rio Verde apresentaram um *cluster* adicional, observado no braço curto do par 19 (**Figura 5c**). Por sua vez, o mapeamento físico do DNAr 5S, em *Moenkhausia* sp. evidenciou a presença de *clusters* em posição pericentromérica do par cromossômicos 1 e 6 (**Figura 5d**). A distribuição cromossômica dos sítios de DNAr 5S em *M. cf. forestii* foi observado em posição centromérica nos pares 1, 2, 6, 8 e 10 (**Figura 5b**).

A FISH, com sonda de DNAr 5S em *M. oligolepis*, mostrou-se particular entre as três populações analisadas. A população do Rio do Sangue apresentou quatro marcações de DNAr 5S definidas na porção centromérica do par cromossômico 1 e 7 (**Figura 5g**). A população do Córrego Corredeira apresentou sítios espalhados na região centromérica e/ou pericentromérica em até 17 cromossomos (incluindo os pares cromossômicos 1 e 7), e marcações centroméricas no par cromossômico portador das RONs (**Figura 5f**). Por sua vez, *M. oligolepis* do município de Xapuri/AC mostrou um padrão de distribuição disperso em até 21 cromossomos marcados em posição pericentromérica e/ou centromérica (**Figura 5e**). Apesar dos distintos padrões de

distribuição do DNAr 5S, sinais fluorescentes foram observados no par cromossômico 1 e 7 das três populações aqui analisadas. A presença de *clusters* de DNAr 5S na região pericentromérica foi coincidente com o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva.

Os resultados de *Double FISH* com sondas de H1 e DNAr 18S, mostraram a co-localização desse sítios em região terminal do braço curto de um único par cromossômico em todas as espécies/populações analisadas (**Figura 6**). No entanto, *M. cf. forestii* e em duas populações de *M. oligolepis* (Córrego Corredeira e Xapuri/AC), os sítios de H1 mostraram-se múltiplos em dois pares cromossômicos, sendo também observado a co-localização com o DNAr 18S em um único par cromossômico (**Figura 6b, e, f**). Apenas em *M. oligolepis* do Xapuri/AC sítios de 18S DNAr foram observados em 7 cromossomos (**Figura 6e**).

O mapeamento físico de snDNA U2 evidenciou sítios múltiplos em todas as espécies de *Moenkhausia*. Em *Moenkhausia* sp., tais sítios foram observados nos pares cromossômicos 4 e 19 (**Figura 7**). Em *M. cf. nigromarginata* o snDNA U2 se apresentou múltiplo nos pares cromossômicos 6, 22 e 24, sendo que neste último par foi sintênico com o DNAr 5S (**Figura 7c**). Por sua vez, em *M. cosmops* o snDNA U2 mostrou-se múltiplo nos pares cromossômicos 6 e 14 (**Figura 7a**). Em *M. cf. forestii* sítios de snDNA U2 foram evidenciados em dois pares cromossômicos submetacêntricos (**Figura 7b**). O mapeamento de *clusters* de snDNA U2 apresentou-se múltiplo nas três populações de *M. oligolepis*, na população do Rio do Sangue foi observado apenas três cromossomos marcados, as demais populações apresentaram quatro cromossomos marcados (**Figura 7g**). O padrão de hibridação com sondas teloméricas demonstra apenas marcações finais em todos os cromossomos, não sendo observado sinal em região intersticial de nenhum cromossomo das espécies analisadas (**Figura 8**).

De modo adicional, aos cromossomos do complemento padrão A, foram observados cromossomos B em *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* (**Figura 4**). Dos onze espécimes de *M. cf. forestii* analisados, seis portavam de 0-3 micromossomos B (**Figura 4a'**). Por sua vez, os

cromossomos B observados nas três populações de *M. oligolepis* e apresentaram-se com morfologias distintas (**Figura 4b, c, d**). Os espécimes de *M. oligolepis* do Rio do Sangue apresentaram de 0-3 microcromossomos B ( $B_{\text{micro}}$ ) (**Figura 4b**). Nos espécimes do Córrego Corredeira foram evidenciados de 0-4 cromossomos B metacêntricos ( $B_{\text{m}}$ ), de tamanho pequeno semelhante ao menor par metacêntrico do complemento A (**Figura 4c**). Na população de *M. oligolepis* do Xapuri/AC foram observados de 0-2 cromossomos B acrocêntricos ( $B_{\text{ac}}$ ) (**Figura 4d**). A frequência desses cromossomos mostrou-se variável, tanto intra-individual como interindividual. Os cromossomos B observados nestas duas espécies de *Moenkhausia* apresentaram distintos padrões heterocromáticos, sendo evidenciados cromossomos B eucromáticos e totalmente/parcialmente heterocromáticos, porém o  $B_{\text{ac}}$  observado em espécimes do Xapuri/AC mostrou-se apenas parcialmente heterocromático. (**Figura 4**).

A utilização da FISH, em indivíduos portadores de cromossomos B, permitiu o mapeamento cromossômico de sítios de DNAr 18S, histona H1 e snDNA U2 nos cromossomos B destas espécies (**Figura 9**). Os resultados, utilizando sonda de DNAr 18S, evidenciaram sinais fluorescentes apenas no microcromossomo B de *M. cf. forestii*, porém, tal sinal não foi observado pela Ag-RONs (**Figura 6b e 9**).

A FISH com sonda de H1 revelou *clusters* na posição terminal do braço longo do cromossomo  $B_{\text{ac}}$  da população do Xapuri/AC e no cromossomo  $B_{\text{micro}}$  da população do Rio do Sangue (**Figura 9**). Sinais fluorescentes de snDNA U2 também foram observados no cromossomo  $B_{\text{micro}}$  da população do Rio do Sangue (**Figura 7g e 9**). Por fim, dos marcadores citogenéticos utilizados, nenhum sinal fluorescente foi observado nos cromossomos  $B_{\text{m}}$  da população do Córrego Corredeira. A aplicação da técnica FISH com a sonda telomérica  $(TTAGGG)_n$  não evidenciou sinais intersticiais em nenhum dos cromossomos B de *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* (**Figura 8 e 9**).

## Discussão

### *Complemento cromossômico padrão e mapeamento de DNA repetitivo*

Os dados obtidos relativos aos números diploides são semelhantes aos resultados encontrados em diferentes espécies de *Moenkhausia* e revelaram números diploides conservados de  $2n=50$  cromossomos, com predominância de cromossomos de dois braços (Portela *et al.*, 1988; Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro *et al.*, 2001; Dantas *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2012b). Apesar da constância do número diploide e a baixa variação do número de braços ( $NF = 96$  à  $100$ ), podemos observar a ocorrência de distintas fórmulas cariotípicas entre espécies e/ou populações de *Moenkhausia* aqui analisadas. Variações na fórmula cariotípica sem alteração do número diploide estão possivelmente relacionadas a rearranjos estruturais não-Robertsonianos tais como, inversões e/ou translocações (Schubert 2007), sugerindo que estes tipos de rearranjos desempenharam um papel importante no processo de diferenciação cariotípica em *Moenkhausia*. Esse tipo de diversificação, sem alterações nos números diploides, é comum a diversos grupos de peixes e incluem representantes de diferentes ordens e famílias (Galetti *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2013; Takagui *et al.*, 2014).

A considerável variação encontrada dos sítios de DNAr 5S em *Moenkhausia*, com algumas espécies/populações apresentando quatro cromossomos marcados e outras apresentando até 21 cromossomos marcados é notável e evidencia a intensa dinâmica evolutiva destes sítios. No entanto, deve-se destacar que a localização intersticial destes sítios é conservada. Embora alguns autores sugerem que esta posição intersticial cromossômica ocupada pelo DNAr 5S promova uma condição mais estável que a região terminal e, portanto, evitaria alterações genômicas exacerbadas que levariam à dispersão de sequências (Mantovani *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2012), nós destacamos que no gênero *Moenkhausia*, tal suposição

não é verdadeira. Nesse sentido, a extensa diversificação observada está provavelmente relacionada com a associação destes sítios a elementos transponíveis, como também suposto em diferentes organismos (Silva *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

Por outro lado, o mapeamento cromossômico do snDNA U2 evidenciou uma distribuição mais conservada entre as espécies, corroborando a ideia de que a localização cromossômica de genes U em espécies próximas é geralmente conservada (Cabral-De-Mello *et al.*, 2012; Utsunomia *et al.*, 2014). Notavelmente, sítios de DNAr 5S e snDNA U2 foram localizados em sintonia e caracterizam mais um exemplo da co-localização destes DNAs repetitivos.

Hashimoto *et al.*, (2011; 2012a) sugeriram que a co-localização de genes para histona e ribossômicos em diferentes gêneros de peixes poderia conferir alguma vantagem seletiva e, provavelmente, estaria relacionado com a tendência de clusterização de genes *housekeeping* (genes com altas taxas de expressão necessários para funções celulares básicas). No presente trabalho, os dados obtidos revelam uma conservada associação dos genes para histona e RNAr 18S em todas as espécies analisadas. Esta característica parece ser ancestral em *Moenkhausia* e se manteve conservada durante a história evolutiva deste grupo, corroborando com a hipótese de clusterização de genes *housekeeping*.

### *Cromossomos B*

Além da similaridade entre os cariótipos das cinco espécies aqui analisadas, duas espécies apresentaram considerável variedade de cromossomos B, representando a primeira descrição destes elementos em *Moenkhausia* cf. *forestii* e *M. oligolepis*. Cromossomos B já foram descritos em duas espécies deste gênero, sendo pequenos cromossomos B em *M. intermedia* e micromossomos em *M. sanctaefilomenae* (Portela *et al.*, 1988; Foresti *et al.*, 1989;

Portela-Castro *et al.*, 2001; Portela-Castro e Júlio-Júnior 2002; Dantas *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2012b). No presente trabalho, uma variação na morfologia dos cromossomos supranumerários foi detectada em diferentes populações de *M. oligolepis* ( $B_{\text{micro}}$ ,  $B_m$  e  $B_{ac}$ ), apontando para a ocorrência de uma notável diversificação destes elementos.

Cromossomos B morfologicamente distintos foram descritos em diferentes espécies de peixes Neotropicais, sendo que microcromossomos são os tipos mais frequentes (Carvalho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009). Tais polimorfismos morfológicos podem ocorrer devido à presença de rearranjos cromossômicos, acúmulo de DNA repetitivo e/ou processos de heterocromatinização (Camacho 2005). Notavelmente, a heterocromatina desempenha um importante papel na diversificação dos cromossomos B. Até o momento, diferentes padrões heterocromáticos são comumente relatados em espécies da família Characidae (Foresti *et al.*, 1989; Salvador e Moreira-filho 1992; Poletto *et al.*, 2010; Voltolin *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2012b). Os padrões heterocromáticos evidenciados nos cromossomos B de *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* indicam uma elevada quantidade de DNA repetitivo.

DNAs repetitivos como DNA satélite, DNAr e DNA histônico foram encontrados nos cromossomos B de diferentes espécies de peixes, tais como *Astyanax scabripinnis* e *A. paranae* (Mestriner *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2014), *Prochilodus lineatus* (Artoni *et al.*, 2006), *Astatotilapia latifasciata* (Poletto *et al.*, 2010; Fantinatti *et al.*, 2011), além da descrição de atividade nucleolar identificada pela técnica Ag-RONs em cromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Hashimoto *et al.*, 2012b). Destaca-se que, nestes estudos, a alocação destas sequências nestes cromossomos tem sido usada como evidência para inferências sobre o provável cromossomo ancestral da espécie portadora do elemento supranumerário. No presente trabalho, a primeira ocorrência de genes para snRNA U2 em microcromossomo B de peixe foi fornecida, fato que havia sido relatado apenas na espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata* (Bueno *et al.*, 2013). Além disso, dois tipos de cromossomos B ( $B_{\text{micro}}$  e  $B_{ac}$ ) encontrados em

*M. oligolepis* possuem *clusters* de histona H1, sugerindo a existência de homologia entre os dois tipos de cromossomos B e apontando para o par portador de sítios de histona H1 e DNAr 18S como candidato a cromossomo ancestral destes cromossomos B. No entanto, não podemos descartar que a presença destas sequências nos cromossomos B possa estar relacionada a eventos de transposição que não implicam diretamente na homologia por origem.

Portanto, a investigação dos cromossomos B descritos no presente trabalho, através da microdissecção e a pintura cromossômica, bem como o sequenciamento massivo desses cromossomos, poderia gerar novas inferências sobre a origem, composição e evolução desses cromossomos.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta dissertação.

**Tabela 1** – Espécimes de *Moenkhausia* coletados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP; F: fêmeas; M: macho.

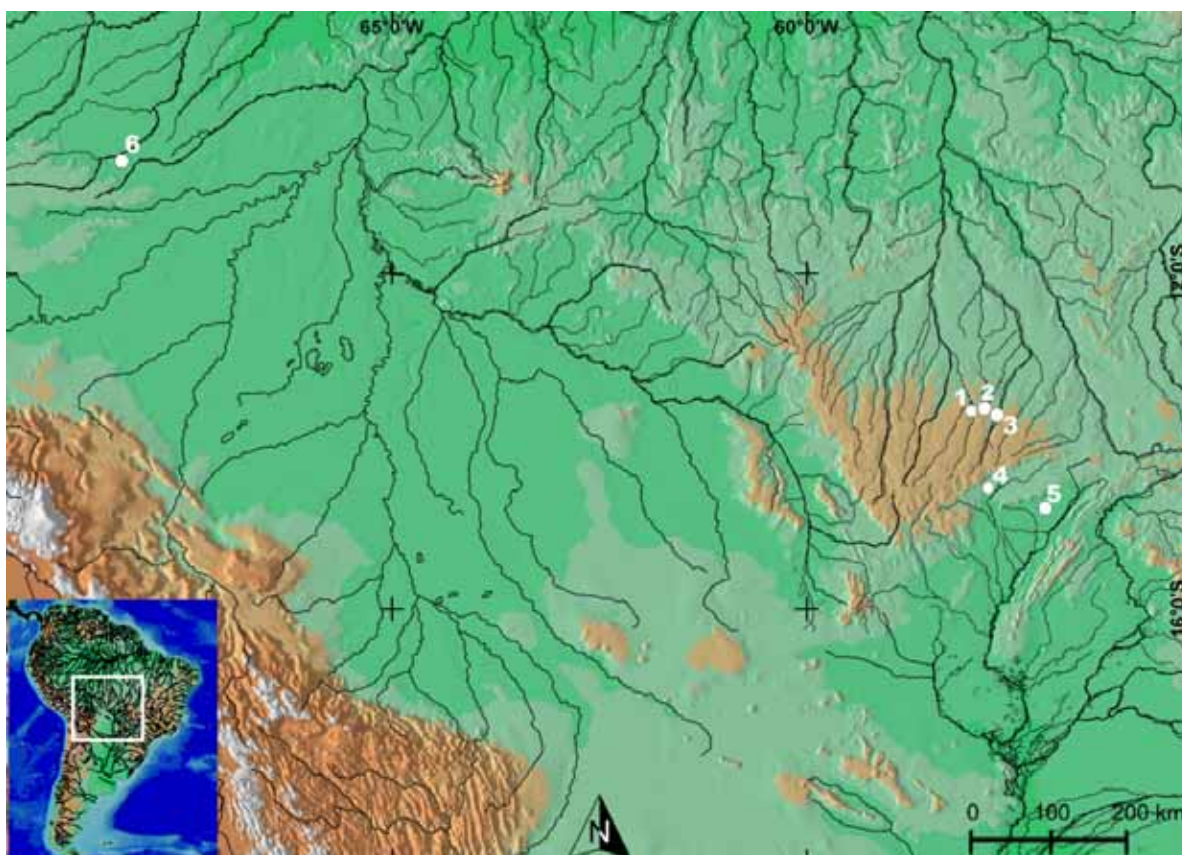
| Espécies                     | Coordenadas                  | Localidade/Município                        | LBP   | Nº Amostral |   |
|------------------------------|------------------------------|---|-------|-------------|---|
|                              |                              |   |       | M           | F |
| <i>Moenkhausia cosmops</i>   | 13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W | Rio Verde –<br>Campo Novo do Parecis/MT     | 8164  | 2           | 2 |
| <i>M. cf. forestii</i>       | 14°33'24.43"S, 57°48'45.53"W | Ribeirão do Sapo –<br>Tangará da Serra/MT   | 19532 | 4           | 8 |
| <i>M. oligolepis</i>         | 14°48'08.33"S, 57°07'25.18"W | Córrego Corredeira –<br>Denise/MT           | 19530 | 4           | 4 |
|                              | 13°41'30.56"S, 57°42'23.28"W | Rio do Sangue –<br>Campo Novo do Parecis/MT | 8527  | 3           | 4 |
|                              | 10°40'03.63"S, 68°15'43.61"W | Córrego Sem Nome –<br>Xapuri/AC             | 18576 | 3           | 2 |
| <i>M. cf. nigromarginata</i> | 13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W | Rio Verde –<br>Campo Novo do Parecis/MT     | 19533 | 1           | 2 |
|                              | 13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W | Rio Membeca –<br>Campo Novo do Parecis/MT   | 8525  | 1           | 0 |
| <i>Moenkhausia</i><br>sp.    | 13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W | Campo Novo do Parecis/MT                    | 19531 | 4           | 1 |

**Tabela 2** – Relação dos *primers* utilizados nas ampliações por PCR.

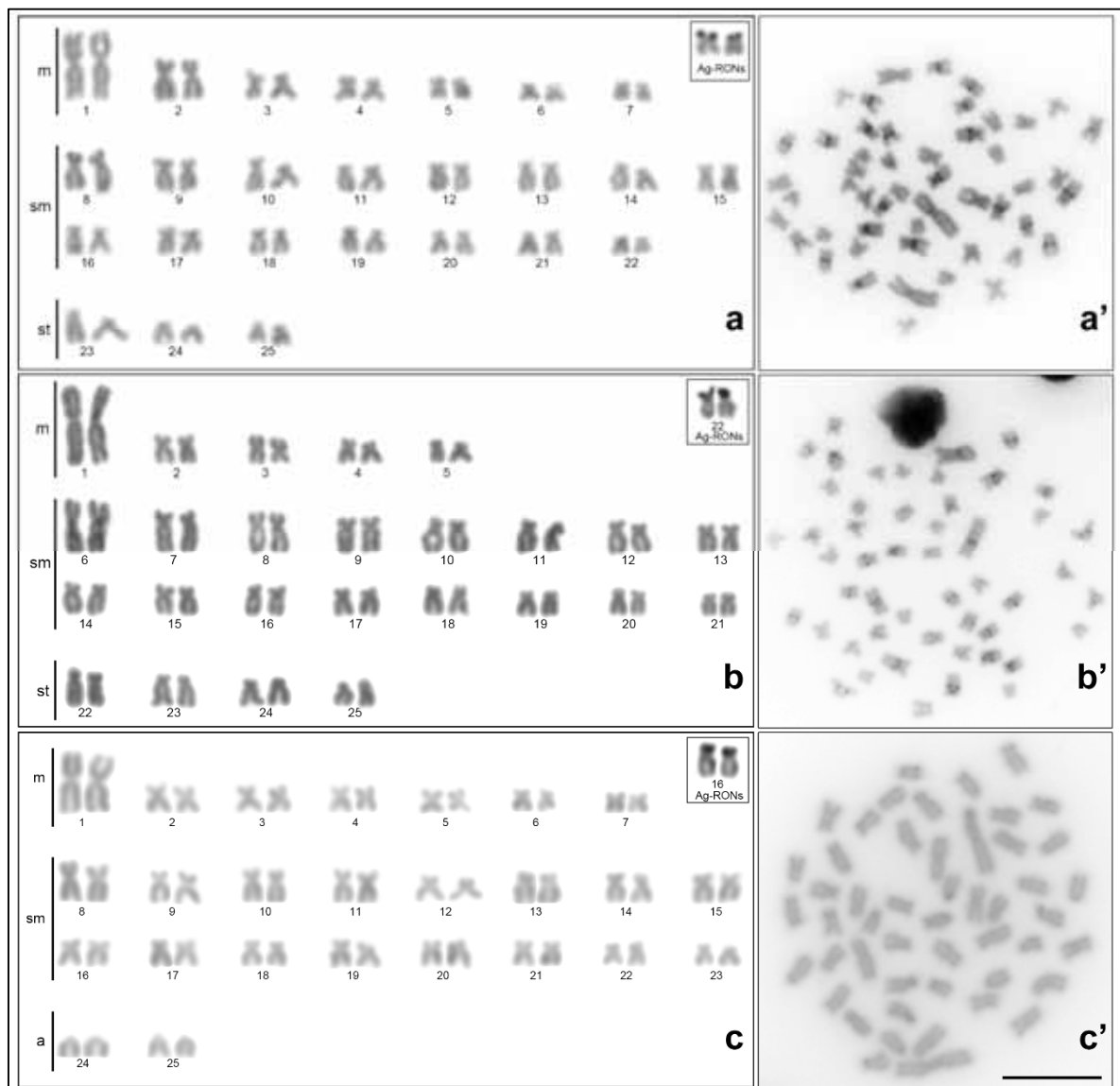
|                   | Região     | Primers | Direção da Sequência (5' → 3')                 | Referência                       |
|-------------------|------------|---------|--|----------------------------------|
| <i>Histona</i>    | <b>H1</b>  | H1F     | <i>forward:</i><br>ATGGCAGAARYCGMCCAG          | Hashimoto <i>et al.</i> , (2011) |
|                   |            | H1R     | <i>forward:</i><br>TACTTCTTCTTGGGSGCTGC        |                                  |
| <i>DNAr</i>       | <b>18S</b> | 18SF    | <i>forward:</i><br>GTAGTCATATGCTTGTCTC         | White <i>et al.</i> , (1990)     |
|                   |            | 18SR    | <i>reverse:</i><br>TCCGCAGGTTACCTACGGA         |                                  |
|                   | <b>5S</b>  | 5SF     | <i>forward:</i><br>TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC  | Pendas <i>et al.</i> , (1994)    |
|                   |            | 5SR     | <i>reverse:</i><br>TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA |                                  |
| <i>snDNA</i>      | <b>U2</b>  | U2F     | <i>forward:</i><br>ATCGCTTCTCGGCCTTATG         | Bueno <i>et al.</i> , (2013)     |
|                   |            | U2R     | <i>reverse:</i><br>TCCCGGCGGTACTGCAATA         |                                  |
| <i>Telomérica</i> | <b>Tel</b> | TelF    | <i>forward:</i><br>(TTAGGG) <sub>n</sub>       | Ijdo <i>et al.</i> , (1991)      |
|                   |            | TelR    | <i>reverse:</i><br>(CCCTAA) <sub>n</sub>       |                                  |

**Tabela 3** – Dados citogenéticos encontrados nas espécies/populações de *Moenkhausia* analisadas no presente trabalho.

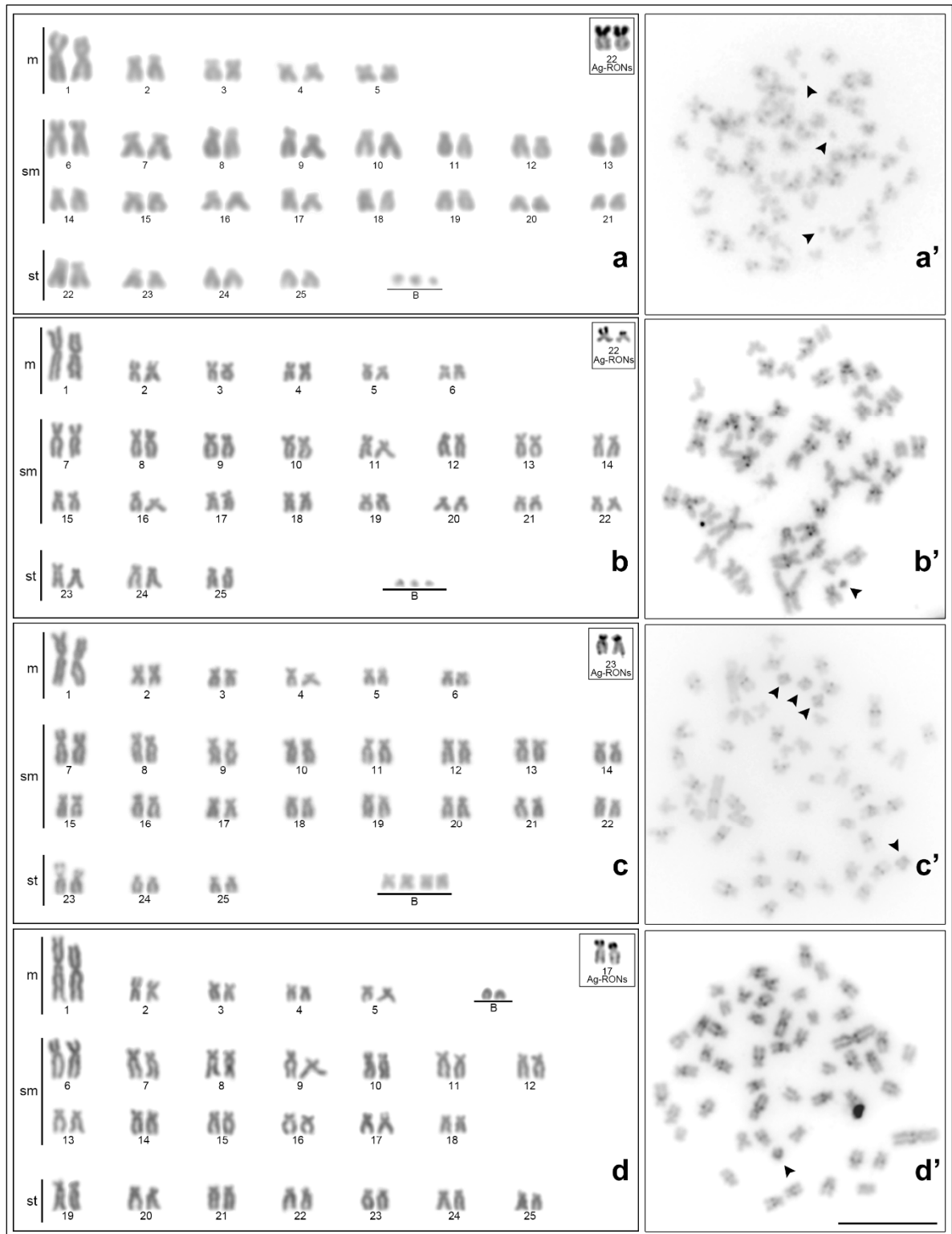
| Espécie                      | Localidade         | Fórmula Cariotípica | NF  | Cromossomo B |
|------------------------------|--------------------|---------------------|-----|--------------|
| <i>Moenkhausia cosmops</i>   | Rio Verde          | 14m+30sm+6st        | 100 | -            |
| <i>M. cf. forestii</i>       | Ribeirão do Sapo   | 10m+32sm+8st        | 100 | 0-3          |
| <i>M. oligolepis</i>         | Córrego Corredeira | 12m+32sm+6st        | 100 | 0-4          |
|                              | Rio do Sangue      |                     |     | 0-3          |
|                              | Xapuri/AC          | 10m+26sm+14st       |     | 0-2          |
| <i>M. cf. nigromarginata</i> | Rio Membeca        | 14m+32sm+4a         | 96  | -            |
|                              | Rio Verde          |                     |     | -            |
| <i>Moenkhausia sp.</i>       | Rio Membeca        | 10m+32sm+8st        | 100 | -            |



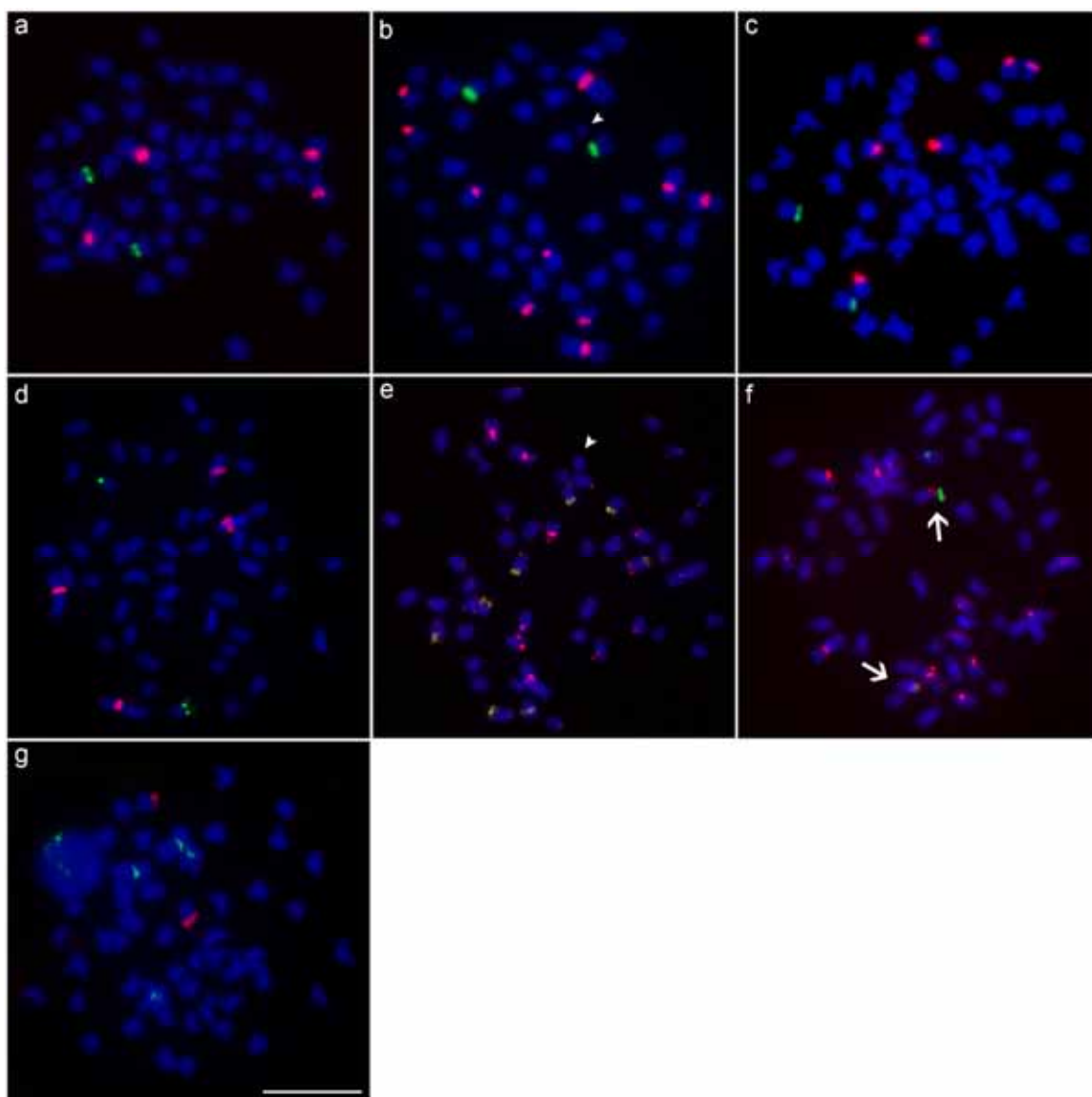
**Figura 2** – Mapa da área de coleta das espécies e ou populações de *Moenkhausia*: **ponto 1** Rio Verde (*M. cosmops* e *M. cf. nigromarginata*); **ponto 2** Rio Membeca (*Moenkhausia sp.* e *M. cf. nigromarginata*); **ponto 3** Rio do Sangue (*M. oligolepis*); **ponto 4** Ribeirão do Sapo (*M. cf. forestii*); **ponto 5** Córrego Corredeira (*M. oligolepis*); **ponto 6** Córrego Sem Nome (*M. oligolepis*).



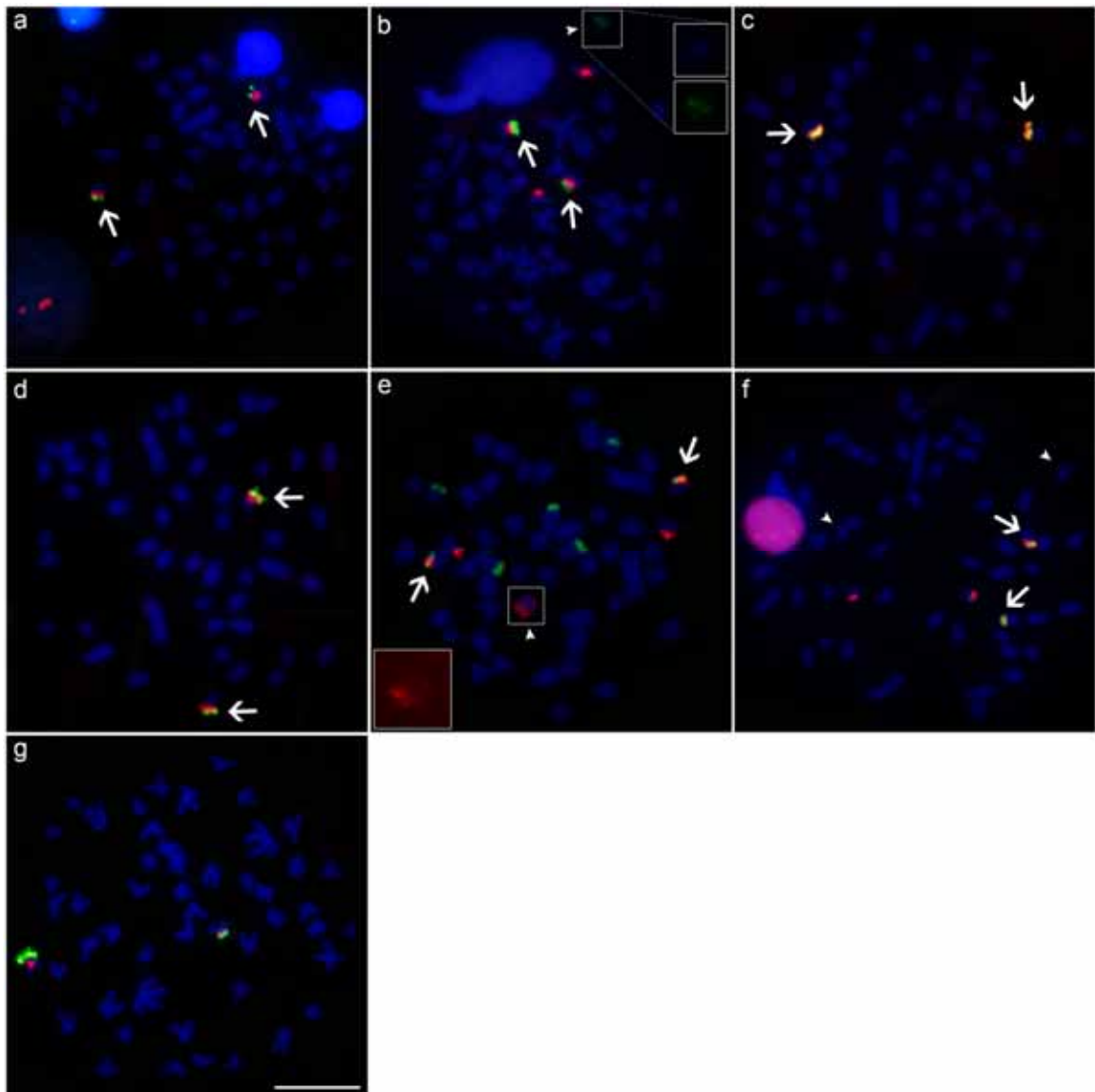
**Figura 3** – Cariótipos corados com Giemsa a 5% (**a**, **b** e **c**) e metáfases após bandamento C (**a'**, **b'** e **c'**) de *Moenkhausia*. Em **a** *M. cosmops*, **b** *M. cf. nigromarginata* e em **c** *Moenkhausia* sp. Nos quadrados o par cromossômico portador das Ag-RONs. A barra equivale a 10 $\mu$ m.



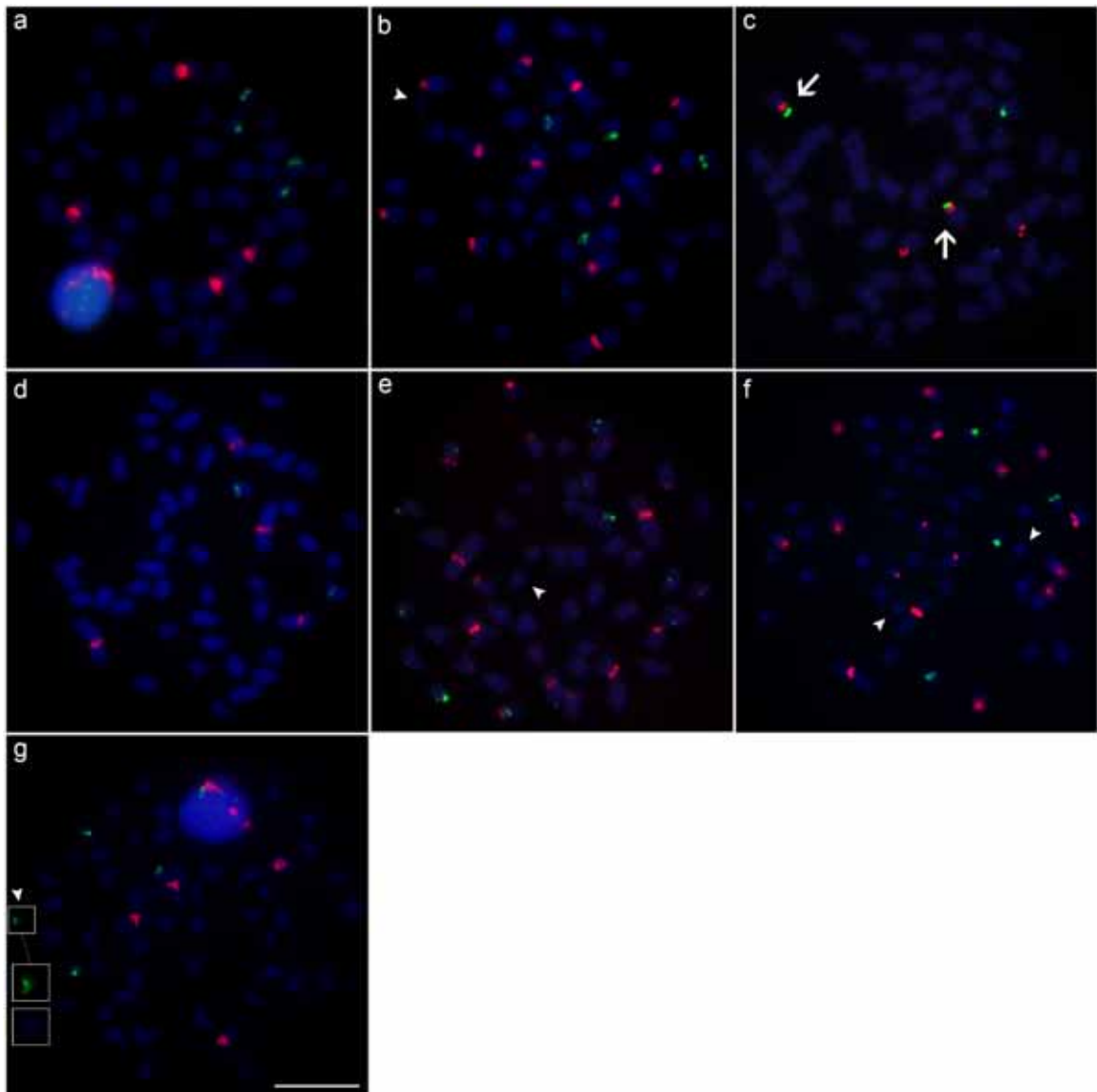
**Figura 4** – Cariótipos corados com Giemsa a 5% (**a**, **b** e **c**) e metáfases após bandamento C (**a'**, **b'** e **c'**) de *Moenkhausia*. Em **a** *M. cf. forestii*; **b** *M. oligolepis* do Rio do Sangue; **c** *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em **d** *M. oligolepis* do Xapuri/AC; Em destaque os cromossomos B encontrados. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. Nos quadrados o par cromossômico portador das Ag-RONs. A barra equivale a 10µm.



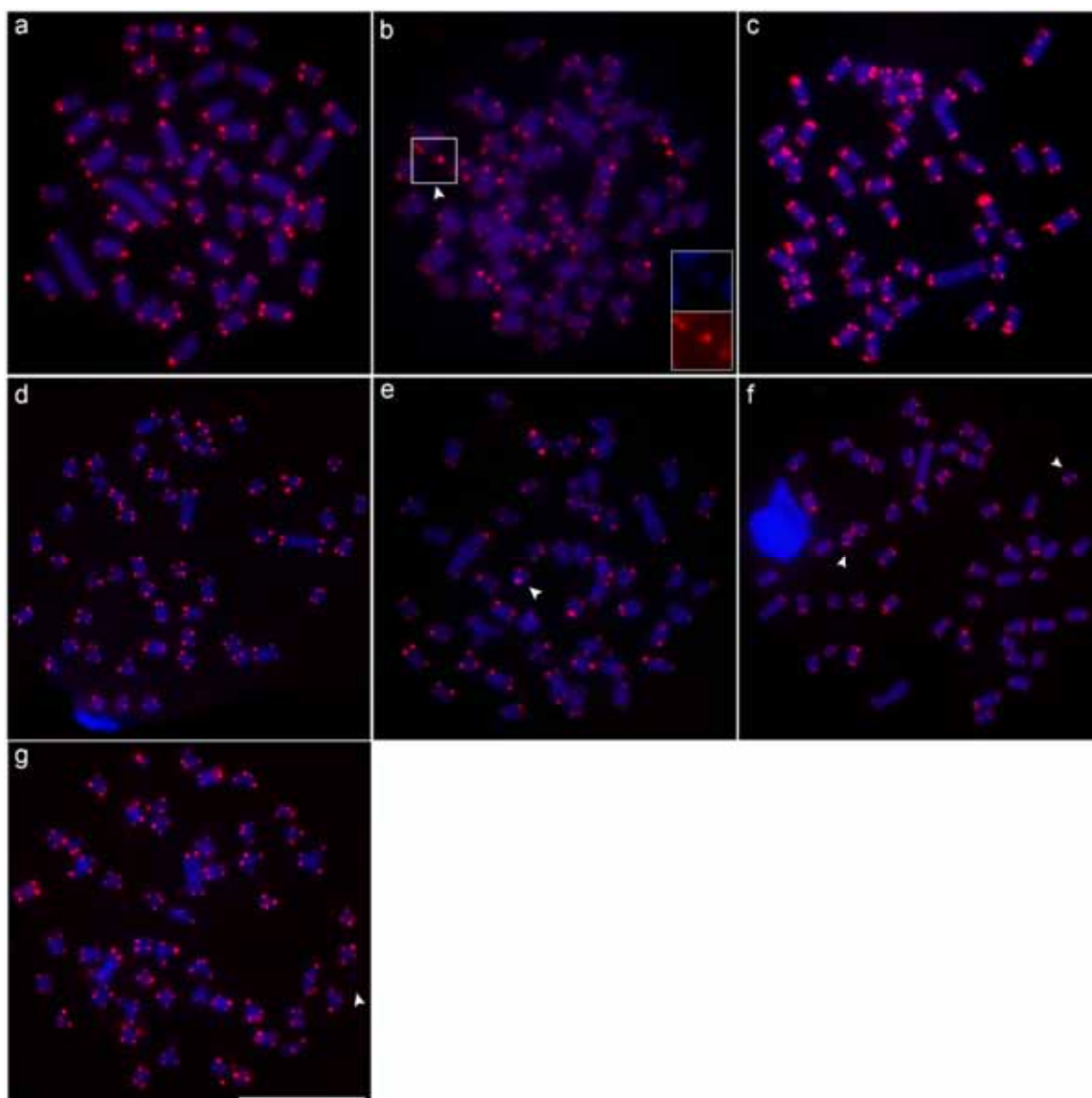
**Figura 5** – Metáfases mitóticas de *Moenkhausia* submetidas ao *Double FISH* com sonda de DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde). Em **a** *M. cosmops*; **b** *M. cf. forestii*; **c** *M. cf. nigromarginata*; **d** *Moenkhausia* sp.; **e** *M. oligolepis* do Xapuri/AC; **f** *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em **g** *M. oligolepis* do Rio do Sangue. As setas indicam os cromossomos com sintenia dos marcadores. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra equivale a 10  $\mu$ m.



**Figura 6** – Metáfases mitóticas de *Moenkhausia* submetidas ao *Double FISH* com sonda de histona H1 (vermelho) e DNAr 18S (verde). Em **a** *M. cosmops*; **b** *M. cf. forestii*; **c** *M. cf. nigromarginata*; **d** *Moenkhausia* sp.; **e** *M. oligolepis* do Xapuri/AC; **f** *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em **g** *M. oligolepis* do Rio do Sangue. As setas indicam os cromossomos com sintenia dos marcadores. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra equivale a 10  $\mu$ m.



**Figura 7** – Metáfases mitóticas de *Moenkhausia* submetidas ao *Double FISH* com sonda de DNAr 5S (vermelho) e snDNA U2 (verde). Em **a** *M. cosmops*; **b** *M. cf. forestii*; **c** *M. cf. nigromarginata*; **d** *Moenkhausia* sp.; **e** *M. oligolepis* do Xapuri/AC; **f** *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em **g** *M. oligolepis* do Rio do Sangue. As setas indicam os cromossomos com sintenia dos marcadores. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A Barra equivale a 10  $\mu$ m.



**Figura 8** – Metáfases mitóticas de *Moenkhausia* submetidas a *FISH* com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>. Em **a** *M. cosmops*; **b** *M. cf. forestii*; **c** *M. cf. nigromarginata*; **d** *Moenkhausia* sp.; **e** *M. oligolepis* do Xapuri/AC; **f** *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em **g** *M. oligolepis* do Rio do Sangue. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

|            | <i>M. cf. forestii</i> | <i>M. oligolepis</i><br>Rio do Sangue | <i>M. oligolepis</i><br>Cór. Corredeira | <i>M. oligolepis</i><br>Xapuri/AC   |
|------------|------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Giemsa     |                        |                                       |   |                                     |
| Banda C    |                        |                                       |   |                                     |
| Ag-RONs    |                        |                                       |   |                                     |
| H1         |                        |                                       |   |                                     |
| DNAr 18S   |                        |                                       |   |                                     |
| snDNA U2   |                        |                                       |   |                                     |
| DNAr 5S    |                        |                                       |   |                                     |
| Telomérica |                        |                                       |   |                                     |
|            | 2µm                    | B <sub>micro</sub>                    | B <sub>micro</sub>                      | B <sub>meta</sub> B <sub>acro</sub> |

**Figura 9** – Cromossomos B de *Moenkhausia* analisados no presente trabalho, após a aplicação de diferentes técnicas citogenéticas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes espécies/populações de *Moenkhausia* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cariotípica neste gênero. Apesar das espécies apresentarem macroestrutura cariotípica semelhante, bem como a maior frequência de  $2n=50$  cromossomos, uma análise cromossômica mais refinada, utilizando o mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos das cinco espécies de *Moenkhausia*, evidenciou diferenças marcantes entre elas.

Os resultados, aqui apresentados, descrevem pela primeira vez o mapeamento de histona H1, snDNA U2 e DNAr 5S em *Moenkhausia cosmops*, *M. cf. forestii*, *M. cf. nigromarginata*, *M. oligolepis* e *Moenkhausia* sp. A localização e distribuição de sequências de genes ribossômicos em representantes de *Moenkhausia* aqui descritos revela uma condição específica para cada uma delas. Enquanto o DNAr 5S mostrou-se aparentemente disperso em algumas espécies/populações pôde-se observar que a histona H1 e o DNAr 18S mostraram-se aparentemente conservados, ocupando regiões e cromossomos morfologicamente semelhantes entre estas espécies, evidenciamos também a co-localização destes sítios em todas as espécies/populações de *Moenkhausia* aqui analisadas.

Descrevemos também novas ocorrências de cromossomos B em *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*. Em uma análise populacional de *M. oligolepis* evidenciamos cromossomos B apresentando morfologias distintas, bem como a presença de sequências de histona H1, DNAr 18S e snDNA U2 alocadas nestes cromossomos B.

Os dados obtidos resultaram em novas informações a respeito da origem e composição dos cromossomos B em peixes e permitem apontar que sequências repetitivas de DNA presentes nos cromossomos do complemento padrão A possam estar ligadas ao processo de formação dos cromossomos supranumerários em *Moenkhausia*. A presença do snDNA U2,

DNAr 18S e da histona H1 identificados em alguns cromossomos B, sugere ainda uma possível origem intraespecífica deste cromossomo. Entretanto, a ausência de sequências no cromossomos B de uma população de *M. oligolepis*, precisa ser melhor investigada, quanto a sua origem e composição.

Portanto, os dados obtidos aqui agregam novas informações sobre a caracterização da diversidade e evolução de espécies do gênero *Moenkhausia*. Podemos destacar a presença de cromossomos B de diferentes morfologias, bem como o mapeamento de sequências repetitivas nestes elementos extras. Os marcadores cromossômicos analisados constituem uma ferramenta importante para melhor conhecimento da distribuição e organização de sequências repetitivas em *Moenkhausia*. Com o desenvolvimento de técnicas citogenéticas moleculares avançadas como a FISH e a microdissecção cromossômica será possível explorar com maior precisão a semelhança entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento A. Por sua vez, a aplicação do sequenciamento de nova geração (NGS), cada vez mais acessível, poderá fornecer novas informações sobre a composição dos cromossomos B.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenito MR, Birchler JA (1993) Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 135:589–97.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In: Olmo E, Redi CA (eds) *Chromosom. today*. Birkhäuser Basel, Basel, pp 169–182
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, *et al.*, (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. doi: 10.1159/000066609
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, *et al.*, (2006) Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127:277–284. doi: 10.1007/s10709-005-4846-1
- Benine RC, Castro RMC, Santos ACA (2007) A new *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Ostariophysi : Characiformes) from Chapada Diamantina, rio Paraguaçu Basin, Bahia, Northeastern Brazil. 5:259–262.
- Benine RC, Mariguela T, Oliveira C (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotrop Ichthyol* 7:161–168.
- Bertaco VA, Jerep FC, Carvalho FR (2011) New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi : Characidae) from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. 9:57–63.

- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *B J Genet* 1:103–120.
- Bougourd SM, Jones RN (1997) B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytol* 137:43–54. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00823.x
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PLoS One* 8:e66532. doi: 10.1371/journal.pone.0066532
- Bugrov AG, Karamysheva T V, Perepelov EA, *et al.*, (2007) DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res* 15:315–25. doi: 10.1007/s10577-007-1128-z
- Cabral-De-Mello DC, Valente GT, Nakajima RT, Martins C (2012) Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosom Res* 20:279–292. doi: 10.1007/s10577-011-9271-y
- Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *R Soc* 355:163–78. doi: 10.1098/rstb.2000.0556
- Camacho JPM (2005) B Chromosomes. In: Gregory TR (ed) *Evol. Genome*. Elsevier, San Diego, pp 223–286
- Carvalho R a., Martins-Santos IC, Dias a. L (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *J Fish Biol* 72:1907–1932. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01835.x

- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–20. doi: 10.1038/371215a0
- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, *et al.*, (2009) Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res* 125:132–41. doi: 10.1159/000227838
- Cole C, Levans C (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol Rev* 3:102.
- Covert SF (1998) Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr Genet* 33:311–9.
- Dantas ESDO, Vicari MR, Souza IL, *et al.*, (2007) Cytotaxonomy and Karyotype Evolution in *Moenkhausia* Eigenmann , 1903 ( Teleostei , Characidae ). *Nucl* 50:505–518.
- Deng HX, Yoshiura K, Dirks RW, *et al.*, (1992) Chromosome-band-specific painting: chromosome in situ suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as a probe pool. *Hum Genet* 89:13–7.
- Eigenmann C (1903) New genera of South American fresh-water fishes, and new names for some old genera. *Smithson Collect* 45:144–148.
- Eigenmann CH (1917) The American Characidae, Part. 1. 310.
- Fantinatti BE a, Mazzuchelli J, Valente GT, *et al.*, (2011) Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica* 139:1273–82. doi: 10.1007/s10709-012-9629-x
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo S A. (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in

- Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107–114. doi: 10.1007/BF00057927
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Genome Res* 31:137–144. doi: 10.1159/000131639
- Galetti PMJ, Aguilar CT, Molina WF (2000) An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420:55–62.
- Graphodatsky AS, Kukekova A V, Yudkin D V, *et al.*, (2005) The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res* 13:113–22. doi: 10.1007/s10577-005-7474-9
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith M A, Rens W, *et al.*, (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 134:64–71. doi: 10.1159/000323512
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith M A, Rens W, *et al.*, (2012a) Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenet Genome Res* 139:102–106. doi: 10.1159/000345299
- Hashimoto DT, Voltolin TA, Paes ADNVA, *et al.*, (2012b) Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). *Comp Cytogenet* 6:141–51. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i2.1769

- Henning F, Trifonov V, Almeida-toledo LF De (2008) Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. 1:279–283.
- 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. doi: 10.1007/BF01953855.
- Ijdo J, Wells R, Baldini A, Reeders S (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, *et al.*, (2003) Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds) Check List Freshw. fishes South Cent. Am., 1st edn. Edipucrs, Porto Alegre, pp 106–169.
- Long H, Qi ZX, Sun XM, *et al.*, (2008) Characters of DNA constitution in the Rye B chromosome. *J Integr Plant Biol* 50:183–189. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00588.x
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, *et al.*, (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87–92.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, *et al.*, (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genet* 12:65. doi: 10.1186/1471-2156-12-65
- Mandrioli M, Manicardi GC (2001) Cytogenetic and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica* 111:433–8.

- Mandrioli M, Manicardi GC, Machella N, Caputo V (2000) Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica* 110:73–8.
- Mantovani M, Dos Santos Abel LD, Moreira-Filho O (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123:211–216. doi: 10.1007/s10709-004-2281-3
- Mariguela TC, Benine RC, Abe KT, *et al.*, (2013) Molecular phylogeny of *Moenkhausia* (Characidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA evidence. *J Zool Syst Evol Res* n/a–n/a. doi: 10.1111/jzs.12025
- Marinho MMF, LANGEANI F (2010) A new species of *Moenkhausia* from the rio Amazonas and rio Orinoco basins (Characiformes: Characidae). *Zootaxa* 2577:57–68.
- Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, O (eds) *Fish Cytogenet.* Enfield, USA, pp 421–453
- Martins C, Galetti PM (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44:903–910. doi: 10.1139/gen-44-5-903
- McAllister BF, Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106:243–253. doi: 10.1007/s004120050245
- McQuade LR, Hill RJ, Francis D (1994) B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae). II. Investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. *Cytogenet Cell Genet* 66:155–161. doi: 10.1159/000133689

- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat Genet* 1:24–8. doi: 10.1038/ng0492-24
- Mestriner C a., Galetti PM, Valentini SR, *et al.*, (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity (Edinb)* 85:1–9. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00702.x
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. *Science* 254:1773–6.
- Mirande JM (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei : Characiformes): from characters to taxonomy. 8:385–568.
- Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, *et al.*, (2012) Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evol Biol* 12:198. doi: 10.1186/1471-2148-12-198
- Navas-Castillo J, Cabrero J, Camacho JPM (1986) Heterochromatin variants in *Baetica ustulata* (Orthoptera: Tettigoniidae) analysed by C and G banding. *Heredity (Edinb)* 56:161–165. doi: 10.1038/hdy.1986.27
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F (eds) *Fish Cytogenet.* Science Publishers, Enfield, USA, pp 111–164
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, *et al.*, (1988) Chromosome Formulae of Neotropical Freshwater fishes.pdf. *Brazil J Genet* 3:577–624.
- Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, *et al.*, (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes) based on multilocus

- analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11:275. doi: 10.1186/1471-2148-11-275
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem* 35:81–100. doi: 10.1007/s10695-008-9250-1
- Pansonato-Alves JC, Hilsdorf a WS, Utsunomia R, *et al.*, (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 141:133–42. doi: 10.1159/000354885
- Pansonato-Alves JC, Serrano ÉA, Utsunomia R, *et al.*, (2014) Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS One* 9:e107169. doi: 10.1371/journal.pone.0107169
- Pastana MNL, Dagosta FCP (2014) *Moenkhausia rubra*, a new species from rio Juruena, upper rio Tapajós basin, Brazil (Characiformes: Characidae). *PLoS One* 9:e107169. doi: 10.1590/1982-0224-20130183
- Pendas AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Genome Res* 67:31–36. doi: 10.1159/000133792
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934–8.
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C (2010) The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genet* 11:1. doi: 10.1186/1471-2156-11-1

- Portela ALDBS, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazil Genet* 11:307–316.
- Portela-Castro A, Júlio-Júnior H (2002) Karyotype relationships among species of the subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomic and evolution aspects. *Cytologia (Tokyo)* 329–336.
- Portela-Castro AL de B, Júlio-Júnior HF, Nishiyama PB (2001) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110:277–83.
- Reis R, Kullander S, Ferraris C (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America, 1º edn. 724.
- Rens W, Fu B, O'Brien PCM, Ferguson-Smith M (2006) Cross-species chromosome painting. *Nat Protoc* 1:783–90. doi: 10.1038/nprot.2006.91
- Ried T, Schröck E, Ning Y, Wienberg J (1998) Chromosome painting: A useful art. *Hum Mol Genet* 7:1619–1626. doi: 10.1093/hmg/7.10.1619
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2012) B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS One* 7:e36600. doi: 10.1371/journal.pone.0036600
- Salvador LB, Moreira-filho O (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* ( Pisces , Characidae ). *Heredity (Edinb)* 69:50–56.
- Santos LP dos, Castro JP, Francisco CM, *et al.*, (2013) Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B. *Molecular Cytogenetics* 6:1–5.

- Sato LR, Oliveira C, Foresti F (2004) Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes: Trichomycteridae). *Genet Mol Biol* 27:45–50. doi: 10.1590/S1415-47572004000100008
- Scacchetti PC, Alves JCP, Utsunomia R, *et al.*, (2012) Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenet Genome Res* 136:131–7. doi: 10.1159/000335658
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 10:109–115. doi: 10.1016/j.pbi.2007.01.001
- Sharbel TF, Green DM, Houben A (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41:14–22. doi: 10.1139/gen-41-1-14
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, *et al.*, (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica* 141:329–36. doi: 10.1007/s10709-013-9732-7
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, *et al.*, (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS One* 9:e94896. doi: 10.1371/journal.pone.0094896
- Silva M, Matoso DA, Vicari MR, *et al.*, (2011) Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res* 134:303–307. doi: 10.1159/000328998

- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Takagui FH, Venturelli NB, Dias AL, *et al.*, (2014) The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic Diversification of the Species *Loricariichthys Anus* and *Loricariichthys Platymetopon*. *Zebrafish* 11:300–305. doi: 10.1089/zeb.2014.0985
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, *et al.*, (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res* 125:286–91. doi: 10.1159/000235935
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217–25. doi: 10.1007/s00412-009-0251-3
- Trifonov V A, Dementyeva P V, Larkin DM, *et al.*, (2013) Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biol* 11:90. doi: 10.1186/1741-7007-11-90
- Trifonov V, Perelman P, Kawada S, *et al.*, (2002) Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosom Res* 10:109–116.
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, *et al.*, (2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G . pantanal*. *Cytogenet Genome Res* 142:286–92. doi: 10.1159/000362258

- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, *et al.*, (2014) Origin and evolution of B chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol Biol Evol* 31:2061–72. doi: 10.1093/molbev/msu148
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenet Genome Res* 122:67–72. doi: 10.1159/000151318
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, *et al.*, (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094–116. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x
- Voltolin TA, Laudicina A, Senhorini JA, *et al.*, (2010) Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (characiformes, prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica* 138:1133–9. doi: 10.1007/s10709-010-9502-8
- Walter BE (2011) Early ontogeny of aquarium-raised *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Characiformes: Characidae). *Ichthyol Res* 59:95–103. doi: 10.1007/s10228-011-0257-8
- White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protoc. A Guid. to Methods Appl.* New York, pp 315–322
- Zanata AM, Birindelli JLO, Moreira CR (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Rio Xingu and Rio Tapajós basins, Brazil, with comments on a putative case of polymorphic Batesian mimicry. *J Fish Biol* 75:2615–28. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02455.x