

Érica Alves Serrano

**ORIGENS DOS CROMOSSOMOS B EM ESPÉCIES DE *Characidium*
(CHARACIFORMES, CRENUCHIDAE) BASEADA EM PINTURA
CROMOSSÔMICA, SEQUÊNCIAS DE rDNA e HISTONAS**

Mestrado

Botucatu

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ORIGENS DOS CROMOSSOMOS B EM ESPÉCIES DE *Characidium*
(CHARACIFORMES, CRENUCHIDAE) BASEADA EM PINTURA
CROMOSSÔMICA, SEQUÊNCIAS DE rDNA e HISTONAS

Érica Alves Serrano

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

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

Botucatu

2013

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!

Mario Quintana

Dedico á minha família - Aparecida, Donizete e Keli, por apoiarem e participarem comigo
desta jornada; me dando força, incentivo e amor sem igual!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fausto Foresti, um exemplo como pessoa e profissional, sempre disponível e aberto para o “novo”. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada.

Ao Dr. José Carlos Pansonato Alves, por ter apostado em mim, e por fazer questão de estar presente em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela dedicação.

Aos amigos Cristian, Priscilla, Ricardo, Duílio e Vivi pelo companheirismo, paciência, discussões, e as conversas nos famosos “cafezinhos” diários, com certeza vocês contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Ao técnico Renato Devidé, pelo auxílio sempre que requisitado, e principalmente pela amizade e alegria.

Ao professor Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação ao trabalho.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Guilherme, Bruno Ferrete, Bruno Melo, Fábio Roxo, Luís Henrique, Maria Lígia, Millke, Luciana, Bruno de Franco, Ricardo Britzki, Raquel, Fernando Yuldi, Fernando Mendonça, Marlon, Gleisy, Tatiane, Vanessa, Daniela, Cristiane, Cristiano e todos os demais alunos do laboratório, pelo auxílio, amizade e todos os momentos que passamos juntos.

A Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Morfologia e a seção de Pós-Graduação que junto aos seus funcionários proporcionaram todas as condições para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

As minhas amigas de Penápolis: Tania e Elaine que fizeram parte do meu crescimento, sempre me incentivando e dando bons conselhos. Apesar de estarmos longe sempre é bom reencontrá-las, obrigada por serem minhas amigas queridas.

As minhas companheiras da graduação, Angélica e Ana Luiza, pela amizade que construímos nesses anos e que a distância nunca abalou.

A minha querida irmã Keli, por ser um exemplo de mulher e dedicação, por ser minha amiga e sempre confiar em mim, agradeço a Deus por ser minha irmã.

Aos meus pais Aparecida e Donizete, agradeço pelo apoio financeiro, e dedicação á mim. Vocês são minha base, a quem eu recorro e confio em qualquer situação, e com certeza grandes responsáveis por este trabalho. Obrigado pelo amor que me deram e ensinaram.

Ao meu namorado Diogo que com carinho e atenção esteve em todos os momentos que precisei. Tenho certeza que com você todos os dias da realização deste trabalho foram mais felizes. Te amo.

E, principalmente a Deus por dar a minha família, as pessoas que amo, e porque essa era a sua vontade.

Resumo

Cromossomos B ou supranumerários são elementos extras ao conjunto padrão A e estão presentes em vários grupos de eucariotos, como plantas, fungos e animais. Podem ter origens distintas, incluindo derivação do conjunto autossômico ou de cromossomos sexuais e até mesmo por cruzamentos interespecíficos, o que os caracterizam como um interessante modelo para estudos genéticos e evolutivos. O advento da técnica de microdissecção cromossômica, método que possibilita o isolamento direto do DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem proporcionado avanços no conhecimento da estrutura e composição destes elementos genômicos em um número significativo de organismos. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar os cromossomos B presentes em três espécies de peixes do gênero *Characidium*, através de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, envolvendo microdissecção dos cromossomos Bs e sexuais, associada à técnica de FISH, assim como hibridação fluorescente *in situ* dos DNAs ribossômicos 5S e 18S e DNAs histônicos H3 e H4. Adicionalmente, estas sequências de DNA repetitivo foram amplificadas, clonadas e sequenciadas a partir do DNA genômico de indivíduos sem cromossomos B e do DNA dos cromossomos B microdissecados. Os resultados obtidos pela pintura cromossômica confirmam que os cromossomos sexuais ZW possuem uma origem única neste grupo, enquanto os cromossomos B possuem dois tipos de origem. Em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, os cromossomos B apresentam origem intraespecífica, relacionada aos cromossomos sexuais, mas independentes, considerando o posicionamento destas espécies na filogenia estabelecida. Por outro lado, em *C. oiticicai* esses elementos podem ter tido uma origem interespecífica, possivelmente relacionada a algum tipo de hibridação introgressiva. A presença de sequências histônicas e de DNAr 5S nos cromossomos B evidenciada pelo mapeamento físico e amplificação por PCR, bem como a baixa divergência genética, apontam

para uma ancestralidade comum entre as sequências presentes nos cromossomos B de *C. gomesi* e *C. pterostictum* e o genoma A destas espécies. Por outro lado, em *C. oiticicai*, as sequências obtidas a partir dos cromossomos B se mostraram muito divergentes das amplificadas do genoma A das três espécies e também das sequências dos cromossomos Bs de *C. gomesi* e *C. pterostictum*. Os resultados obtidos com a análise dessas sequências repetitivas corroboram a hipótese proposta com base nos dados da pintura cromossômica e ainda caracterizam esses supranumerários como quebra-cabeças de sequências repetitivas provenientes de vários cromossomos do complemento A.

Abstract

B or supernumerary chromosomes are extra elements to the standard set A and are present in several groups of eukaryotes, such as plants, fungi and animals. They may have different origins, including derivation of autosomal or sex chromosomes and even by interspecific crosses, which make them as an interesting model for genetic and evolutionary studies. The advent of chromosome microdissection technique, a method that allows the direct isolation of DNA from any region cytogenetically recognized, has provided new information on the structure and composition of these genomic elements in a significant number of organisms. In this sense, the present work was developed aiming to analyze the B chromosomes present in three fish species of the genus *Characidium* through classical and molecular cytogenetic techniques involving microdissection of B and sex chromosomes associated with the FISH technique, as well as fluorescent in situ hybridization of 18S and 5S ribosomal DNAs and genes for the H3 and H4 histones. Additionally, these repetitive DNA sequences were amplified, cloned and sequenced from genomic DNA of individuals without B chromosomes and from B chromosomes DNA microdissected. The results obtained by chromosome painting confirmed that the ZW sex chromosomes have a single origin in this group, while the B chromosomes have two types of origin. In *C. gomesi* and *C. pterostictum*, B chromosomes apparently exhibit an intraspecific origin, related to sex chromosomes, but, considering the placement of these species in the phylogeny established, in independent events. Moreover, in *C. oiticicai* these elements might have had an interspecific origin, possibly related to some sort of hybridization by introgression. The presence of histone sequences and 5S rDNA in B chromosomes evidenced by physical mapping and PCR amplification, as well as low genetic divergence, indicate a common ancestry between sequences present in B chromosomes of *C. gomesi* and *C. pterostictum* and the A genome of these species. Moreover, in *C. oiticicai*, sequences derived from the B chromosomes are very different from the genome amplified of

the three species as well as from the sequences of B chromosomes of *C. gomesi* and *C. pterostictum*. The results obtained from the analysis of these repetitive sequences corroborate the hypothesis proposed based on data from chromosome painting and still characterize these supernumerary as puzzles repetitive sequences from several chromosomes complement A.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Os cromossomos B.....	1
1.1.1 Composição dos cromossomos B.....	2
1.1.2 Origem dos cromossomos B.....	3
1.1.3 Cromossomos B em peixes Neotropicais.....	5
1.2 O gênero <i>Characidium</i>	7
1.2.1 Cromossomos B no gênero <i>Characidium</i>	8
1.3 Considerações sobre a microdissecção cromossômica.....	9
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Materiais.....	14
3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta.....	15
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Estimulação de Mitoses.....	18
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.	19
3.2.3 Identificação da Heterocromatina Constitutiva.....	20
3.2.4 Extração de DNA genômico.....	21
3.2.5 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	21
3.2.5.1 Microdissecção.....	21

3.2.5.2 Amplificação- Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplifition (WGA4 – Sigma).....	22
3.2.5.3 WGA3- Reamplificação e Marcação.....	23
3.2.5.4 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S.....	24
3.2.5.5 Preparação das sondas para histonas H3 e H4.....	25
3.2.6 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i>	27
3.2.7 Caracterização do DNAr 5S e histona H3.....	28
3.2.7.1 Isolamento do DNAr 5S por PCR	29
3.2.7.2 Isolamento da histona H3 por PCR.....	29
3.2.7.3 Eluição das bandas obtidas pela amplificação por PCR do DNAr 5S e histona H3.....	30
3.2.7.4 Clonagem das bandas eluídas do DNAr 5S e histona H3.....	31
3.2.7.5 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes.....	31
3.2.7.6 Extração do DBA plasmidial.....	32
3.2.7.7 PCR para confirmação da presença de insertos.....	32
3.2.8 Reação de sequenciamento para amostras clonadas do DNAr 5S e histona H3.....	32
3.2.8.1 Limpeza da reação de sequenciamento.....	33
3.2.8.2 Sequenciamento.....	34
3.2.9 Análises moleculares.....	34
3.2.9.1 Análises das sequências obtidas dos cromossomos B microdissecados.....	34
3.2.9.2 Análise de DNA mitocondrial.....	35
3.2.10 Estudos Cariotípicos	36
4 Resultados e Discussão	37

4.1 Capítulo 1 - Origem única para cromossomos sexuais e origens múltiplas para cromossomos B em peixes do gênero <i>Characidium</i>.....	38
4.2 Capítulo 2 - Evidência de DNAr 5S e sequências histônicas em cromossomos B, confirmam independentes origens para estes elementos em espécies do gênero <i>Characidium</i> (Characiformes, Crenuchidae).....	66
5 Considerações finais	88
6 Referências	91

1 Introdução

1.1 Cromossomos B

O genoma eucarioto não é apenas composto de sequências nucleotídicas e genes encontrados nos cromossomos do complemento A, mas também de elementos egoístas que não obedecem às leis mendelianas. Dentre eles estão os elementos transponíveis, distorcedores de segregação, fatores citoplasmáticos e os cromossomos B (Camacho et al, 2000). Cromossomos B são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão A e já foram encontrados em cerca de 15% das espécies eucarióticas, sendo no reino animal encontrados em 263 espécies (Jones, 1982). São considerados dispensáveis devido a sua presença apenas em alguns indivíduos de algumas populações em algumas espécies, e provavelmente surgiram a partir de cromossomos do complemento padrão A. No entanto, na maioria dos casos não apresentam homologia ou semelhança estrutural e morfológica com estes, seguindo seu próprio caminho evolutivo (Camacho et al, 2000).

Em sua maioria, os cromossomos B são heterocromáticos, mas existem aqueles parcialmente heterocromáticos ou totalmente eucromáticos. Seu comportamento mitótico e meiótico irregular permite o acúmulo em linha germinativa, com taxas de transmissão superiores a taxa normal de 50%. A significância adaptativa em populações ainda é desconhecida para estes cromossomos, apesar de várias tentativas de ligá-los a variações fenotípicas e meio ambiente. Em alguns casos, há fortes evidências que são apenas parasitas, mas sua origem concreta ainda é desconhecida (Jones, 1991).

Devido a sua ocorrência generalizada na natureza e às suas propriedades enigmáticas, cromossomos B se apresentam como sistemas experimentais para resolver uma variedade de questões em citogenética molecular e biologia de populações (Jones, 1991). Atualmente, têm sido realizados estudos intensivos em relação à possível função destes

elementos genômicos, incluindo desde a análise da distribuição nas espécies, passando por investigações sobre sua estrutura, origem, transmissão, dinâmica populacional e evolução e até a integração destes cromossomos com os do conjunto genômico A. No entanto, o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular e estrutural destes elementos ainda pode ser considerado bastante restrito (Camacho et al, 2000; Bugrov et al, 2007).

1.1.1 Composição dos cromossomos B

Cromossomos B são em grande parte compostos de sequências de DNA repetitivo que variam em tipo e número de cópias como resultado de *crossing-over* desigual e recombinação reduzida. Muitos estudos apontam que o conteúdo de DNA repetitivo presente nos cromossomos B é muito maior quando comparado com ao do DNA do genoma que o originou, sugerindo uma massiva amplificação dessas sequências repetitivas em uma curta escala de tempo (Camacho et al, 2000).

A introdução da técnica de microdissecção cromossômica no início da década de 1990 permitiu uma abordagem mais direta sobre estrutura e composição molecular dos cromossomos B. Até o momento, esta técnica já foi aplicada de modo expressivo no estudo dos cromossomos B de vegetais, fungos e animais como, *Secale cereale* (Long et al, 2008), *Petauroides volans* (McQuade et al, 1994), *Crepis capillaris* (Jamilena et al, 1995), *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel et al, 1998), *Dicamptodon tenebrosus* (Brinkman et al, 2000), *Nyctereutes procyonoides* (Trifonov et al, 2002), *Apodemus peninsulae* (Trifonov et al, 2002; Rubtsov et al, 2004), *Zea mays* (Cheng e Lin, 2003), *Podisma sapporensis* (Bugrov et al, 2003), *Podisma kanoi* (Bugrov et al, 2007), *Locusta migratoria* (Teruel et al, 2009; 2010), *Astyanax scabripinnis* (Vicari et al, 2011), *Eyprepocnemis plorans* (Muñoz-Pajares et al,

2011) *Lithochromis rubripinnis* (Yoshida et al, 2011), *Phakopsora pachyrhizi* (Tremblay et al, 2008) e fungos micorrízicos arbusculares (Pawlowska e Taylor, 2005).

Alguns destes estudos confirmaram que os cromossomos B contêm principalmente sequências de DNA repetitivo, entre os quais DNA ribossomal, DNA centromérico e telomérico, além de elementos móveis (Camacho, 2005). Em apenas cinco casos, no fungo *Nectria haematococa* (Miao et al, 1991), em espécies de canídeos (Graphodatsky et al, 2005; Yudkin et al, 2007), nos gafanhotos *Locusta migratoria* (Teruel et al, 2010) e *Rhammatocerus brasiliensis* (Oliveira et al, 2011) e no ciclídeo *Lithochromis rubripinn* (Yoshida et al, 2011), foram encontrados genes para proteínas em cromossomos B.

Estudos realizados em *Locusta migratoria* envolvendo a amplificação e mapeamento cromossômico de diversas sequências de DNA repetitivo (Teruel et al, 2010), foi possível localizar o DNAr 45S nos pares cromossômicos 2, 6 e 9 e o DNAr 5S nos pares 3, 9 e 11. Porém, estas sequências não estavam presentes no cromossomo B desta espécie. Por outro lado, hibridações com sondas para as sequências das proteínas H3 e H4 possibilitaram observar a presença de *clusters* para essas proteínas no cromossomo B e também no oitavo par autossômico, indicando que possivelmente os cromossomos B dessa espécie tiveram origem a partir deste par. As análises das sequências das proteínas H3 e H4 obtidas a partir do DNA do cromossomo B e do DNA total de indivíduos sem cromossomos B revelaram uma média de divergência baixa, sugerindo uma ancestralidade comum entre as sequências dos cromossomos B e do cromossomo autossômico 8. Ainda, algumas sequências de DNA das proteínas H3 e H4 isoladas do cromossomo B apresentaram a mesma sequência de aminoácidos encontrada no DNA do genoma total, sugerindo que elas estão ativas (Teruel et al, 2010).

1.1.2 Origem dos cromossomos B

Muitas teorias já foram postuladas na tentativa de explicar a origem para os cromossomos B. As primeiras análises realizadas nas décadas de 1970 e 1980 demonstraram que os cromossomos B continham DNA semelhante ao encontrado no complemento A (Camacho et al, 2000), levando á formulação da mais tradicional e amplamente aceita versão de que os cromossomos B são derivados dos cromossomos A (Jones e Rees, 1982). Nesta perspectiva, poderíamos considerar a origem do cromossomo B como um simples subproduto da evolução do cariótipo padrão (Camacho et al, 2000).

O compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre os cromossomos B e os do complemento A caracteriza-se como uma situação já observada em diferentes organismos, como foi demonstrado em *Vulpes vulpes* (Yang et al, 1999), *Apodemus peninsulae* (Rubtsov et al, 2004), *Podisma sapporensis* (Bugrov et al, 2004), *P. kanoi* (Bugrov et al, 2007), *Locusta migratoria* (Teruel et al, 2009) e *Rhammatocerus brasiliensis* (Oliveira et al, 2011).

Por outro lado, a origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais também tem sido frequentemente postulada, principalmente em alguns gêneros de gafanhotos (Hewitt, 1979; Camacho, 2005). Em *Eyprepocnemis plorans* o arranjo de duas sequências, uma repetição de 180 bp e DNAr, coincidem especificamente com o centrômero do cromossomo X, indicando que o cromossomo B nessa espécie provavelmente derivou deste cromossomo sexual (Lópes-León et al, 1994). Por outro lado, em *Locusta migratoria* foi identificada a presença das proteínas H3 e H4 restritas ao cromossomo B e ao oitavo par autossômico. Estes resultados foram conclusivos para revelar a origem dos elementos extras nesta espécie a partir do cromossomo 8 do genoma A. Em *Rhammatocerus brasiliensis*, o fato do complemento A compartilhar os genes de DNAr 5S e histona H3 com o cromossomo B não foi informativo no esclarecimento da origem desse elemento genômico, devido a intensa propagação desses genes nos cromossomos do conjunto padrão A (Oliveira et al, 2011).

1.1.3 Cromossomos B em peixes Neotropicais

Existem aproximadamente 1000 espécies de peixes Neotropicais cariotipadas e cromossomos B já foram relatados ocorrer em 23 dessas espécies (Oliveira et al, 2009). Contudo, muitos destes estudos concentraram-se apenas na descrição da ocorrência e da frequência destes elementos genômicos extras nos indivíduos. Quanto a sua morfologia, esses cromossomos apresentam uma variabilidade considerável, assim como em tamanho e número, podendo ser microcromossomos B como os encontrados em *Cyphocharax modestus* (Gravena et al, 2007), *Prochilodus* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al, 1999; Cavallaro et al, 2000; Oliveira et al, 2003; Artoni et al, 2006; Voltolin et al, 2009) *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al, 1989), de tamanho médio como observado em *Callichthys callichthys* (Erdtmann, 1990), ou macrocromossomos como no gênero *Astyanax* (Maistro et al, 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Vicente et al, 1996; Moreira-Filho et al, 2001; Ferro et al, 2003; Hashimoto et al, 2008) e no cíclideo africano *Haplochromis obliquidens* (Poletto et al, 2010). Já o cromossomos B presente no peixe europeu *Alburnus alburnus* pode ser considerado um gigante genômico apresentando-se maior que o primeiro par do complemento A, representando 10% do seu genoma total (Schmid et al, 2006).

Os dados existentes referentes ao maior número de supranumerários encontrados na ordem Characiformes são para *Prochilodus lineatus*, com até nove cromossomos B (Voltolin et al, 2011) e *Moenkhausia sanctaefilomenae*, com até oito microcromossomos B (Foresti et al, 1989). Erdtmann (1990) encontrou até dezesseis cromossomos B de tamanho médio em uma espécie de Siluriformes, *Callichthys callichthys*. Há registros de números menores como encontrado em *Steindachnerina insculpta*, onde foi descrita a ocorrência de até dois microcromossomos B (Oliveira e Foresti, 1993) e no trabalho realizado por Moraes et al

(2009) que identificaram a presença de uma variação intra-individual e interindividual de um a dois supranumerários em exemplares de *Rhamdia quelen*.

A maior abundância de espécies apresentando cromossomos supranumerários entre os peixes é encontrada na ordem Characiformes, que estão presentes em 31 espécies de seis famílias distintas: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Paradontidae e Prochilodontidae. Estas espécies representam 50,82% de todas as espécies com cromossomos B (Carvalho et al, 2008), sendo em *Prochilodus lineatus*, coletado no Rio Mogi-Guaçu o primeiro relato de ocorrência de cromossomos B em peixes Neotropicais (Pauls e Bertollo, 1983).

Trabalhos realizados em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al, 2000; Vicari et al, 2011) e em *Prochilodus lineatus* (Maistro et al, 2000; Jesus et al, 2003; Artoni et al, 2006) são ainda alguns dos poucos realizados envolvendo a análise da composição dos cromossomos B. O uso de endonucleases de restrição em *P. lineatus* evidenciou que os cromossomos B possivelmente possuem uma constituição genômica que difere da constituição do complemento A, possivelmente em consequência de alterações que esses cromossomos sofreram no seu processo de diferenciação, sugerindo uma origem não recente para os cromossomos B neste grupo (Maistro et al, 2000). Em *A. scabripinnis* (Mestriner et al, 2000) foi proposto que o macrocromossomo supranumerário metacêntrico existente na amostra analisada corresponderia a um isocromossomo. Esta hipótese foi sustentada com base na simetria apresentada por sequência de DNA satélite presente em ambos os braços do cromossomo B, além da homologia funcional entre estes, caracterizada pelo auto-pareamento durante a meiose (Mestriner et al, 2000). Já no peixe *Alburnus alburnus*, o cromossomo B existente possivelmente deriva de elementos transponíveis da família de retrotransposons Gypsy/Ty3, também encontrados em *Drosophila* (Ziegler et al, 2003).

1.2 O gênero *Characidium*

O gênero *Characidium* compreende um grupo de peixes de tamanho relativamente pequeno, normalmente menores do que 10 cm de comprimento. Este gênero é o mais representativo grupo da família Crenuchidae, compreendendo cerca de 50 espécies válidas, que estão amplamente distribuídas na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá (*Characidium marshi*) até a Argentina (*Characidium rachovi*) (Buckup, 2003).

Este grupo de peixes é particularmente interessante para estudos citogenéticos por apresentar um diversificado modelo de cromossomos sexuais (Vicari et al, 2008; Maistro et al, 2004; Centofante et al, 2001; Pansonato et al, 2011) como também pela ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro et al, 2004; Venere et al, 1999).

Tendo em vista a grande quantidade de espécies que esse gênero possui, os estudos citogenéticos para este grupo ainda são poucos e recentes, restritos somente a algumas espécies de *Characidium* (Miyazawa e Galetti Jr, 1994; Maistro et al, 1998 e 2004; Centofante et al, 2001 e 2003; Silva e Maistro, 2006; Vicari et al, 2008 e Noleto et al, 2009; Pansonato-Alves et al, 2010).

De acordo com os trabalhos realizados as espécies analisadas até o momento apresentam macroestrutura cariotípica bastante conservada, com número diploide constante de 50 cromossomos e predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Por outro lado, a identificação do sistema ZZ-ZW de diferenciação sexual (Maistro et al, 1998 e 2004; Centofante et al, 2001 e 2003; Noleto et al, 2009; Pansonato-Alves et al, 2010, 2011a e b), a ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro et al, 1998; Pansonato-Alves et al, 2010, 2011a e b) e a presença de RONS (regiões organizadoras de nucléolo) em diferentes cromossomos do cariótipo (Maistro et al, 1998; Vicari et al, 2008) e até mesmo a ocorrência de indivíduos poliplóides (Centofante et al, 2001; Pansonato et al, 2011b), evidenciam a

grande variabilidade existente na estrutura cromossômica de determinadas espécies de *Characidium*.

1.2.1 Cromossomos B no gênero *Characidium*

Cromossomos B já foram evidenciados em algumas espécies do gênero *Characidium*, como aqueles encontrados em *C. cf. zebra* (Miyazawa e Galetti, 1994; Venere et al, 1999), *C. oiticicai* e *C. pterostictum* (Pansonato et al, 2010), e *C. gomesi* (Pansonato et al, 2011a). Análises dos padrões de heterocromatina destas espécies revelaram que os cromossomos supranumerários apresentam-se em distintos graus e processos de heterocromatinização (Pansonato-Alves et al, 2010 e 2011b). Em *C. pterostictum* e em *C. oiticicai*, estes elementos genômicos são representados por microcromossomos e apresentam um padrão irregular de heterocromatinização, enquanto que *C. gomesi* apresenta cromossomos maiores, nitidamente acrocêntricos e totalmente heterocromáticos. Já em *C. cf. zebra* (Miyazawa e Galetti Jr, 1994) estes elementos genômicos são morfologicamente semelhantes aos cromossomos B de *C. gomesi*, apresentando-se, contudo, totalmente eucromáticos.

As análises cariotípicas e citogenéticas realizadas em representantes deste gênero, na tentativa de identificar a origem e os processos envolvidos na diferenciação dos cromossomos B em *C. gomesi* e em *C. pterostictum* parecem indicar que estes eventos poderiam ter ocorrido a partir de rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos sexuais e as regiões organizadoras de nucléolo. *Characidium gomesi* e *C. pterostictum* possuem populações com e sem cromossomos B, bem como populações com polimorfismos no posicionamento e localização do DNAr 18S (Pansonato-Alves et al, 2010; 2011a). Tendo em vista que a evolução dos cromossomos sexuais a partir de um par homomórfico ancestral portador de

DNAr caracteriza-se como um evento cada vez mais comum no gênero *Characidium* (Machado et al, 2011), o processo de diferenciação a que estes cromossomos sexuais estão submetidos possivelmente deve ter levado à total heterocromatinização do cromossomo W e de partes do Z, possibilitando a perda de conteúdo gênico no cromossomo sexo-específico e a ocorrência de polimorfismos numéricos estruturais (Pansonato-Alves et al, 2010).

1.3 Considerações sobre a microdissecção cromossômica

A técnica de microdissecção cromossômica é um método utilizado com a finalidade de isolar diretamente o DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material microdissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo o estabelecimento de sondas para FISH (micro-FISH), construção de bibliotecas cromossômicas bandas-específicas e mapeamento físico de cromossomos para análise citogenética. Em estudos de citogenética humana, esta técnica, quando aliada a metodologias de citogenética clássica tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica para a caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer et al, 1992; Wiltshire et al, 2001; Nuntakarn et al, 2002; Hu et al, 2004). Em estudos de evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de diferentes organismos, incluindo primatas (Neusser et al, 2005), cervídeos (Li et al, 2005), roedores (Marchal et al, 2004) e insetos (Teruel et al, 2009), entre outros.

Em peixes, especificamente com relação às espécies da região Neotropical, a aplicação da técnica de microdissecção, aliada à pintura cromossômica, tem se mostrado muito eficaz. Em um estudo realizado por Diniz et al. (2008), a utilização de uma sonda elaborada por microdissecção do cromossomo Z de *Triportheus nematurus*, para hibridação sobre os cromossomos de várias outras espécies deste mesmo gênero (*T. trifurcatus* *T.*

guentheri, *T. cf. signatus*, *T. albus*, *T. angulatus*, *T. nematurus*), evidenciou, em machos e fêmeas, uma hibridação completa do cromossomo Z, ou seja, a sonda sintetizada apresentou homologia para estas espécies, confirmando o conservadorismo deste cromossomo no gênero *Triportheus*. Por outro lado, o cromossomo W mostrou sinais reduzidos de hibridação distribuídos preferencialmente nos braços curtos e na região intersticial dos braços longos desse cromossomo, variando de acordo com a espécie analisada, dando indicações de que esse cromossomo estaria ainda em processo de diferenciação. Hibridações da sonda Z realizadas em outros gêneros de Characidae (*Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *A. fasciatus* e *Salminus hilarii*) se mostraram negativas, evidenciando a independência do processo diferenciação dos cromossomos sexuais, além de reforçar a proposta de que o sistema ZZ/ZW deve representar, de fato, uma condição sinapomórfica característica no gênero *Triportheus*, possivelmente pré-datando a especiação neste grupo.

Um trabalho realizado envolvendo a pintura cromossômica do cromossomo W e DNAr 18S em representantes do gênero *Characidium*, permitiu inferir o caminho evolutivo seguido para a diferenciação dos cromossomos sexuais e regiões organizadoras de nucléolo (Machado et al, 2011). A hibridação com a sonda W obtida de *C. gomesi* apresentou sinais fracos em alguns cromossomos de *C. zebra*, sinais dispersos nos cromossomos W e Z de *C. lauroi*, no sítio proximal dos braços longos do cromossomo Z e no cromossomo W inteiro em populações de *C. gomesi*. Esses resultados demonstraram que o DNA repetitivo presente nos cromossomos sexuais de diferentes espécies/populações de *Characidium* são bastante conservados, apesar da diversificação morfológica apresentada. A hibridação de sequências específica do cromossomo W em regiões terminais de alguns autossomos em todas as populações/espécies analisadas revela que as unidades de repetição que compõe e diferenciam os cromossomos sexuais em *Characidium* são comuns para este gênero. Os autores levantam a hipótese que os cromossomos sexuais de *Characidium* tiveram uma origem comum, e

sofreram diversificações em etapas sequenciais. Essas etapas se iniciariam em rearranjos estruturais de um cromossomo proto-sexual presente em *C. zebra*, seguido pela erosão de genes e amplificação da heterocromatina, diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais, e transposição das RONS, dando origem aos distintos padrões observados entre as espécies/populações do gênero *Characidium* (Machado et al, 2011).

No gênero *Eigenmannia*, Henning et al (2011) realizaram análises moleculares juntamente com a pintura cromossômica, com o objetivo de estabelecer os processos de diferenciação cariotípica e as possíveis relações filogenéticas entre os representantes deste grupo. Experimentos de hibridação com sondas dos cromossomos sexuais de duas espécies deste gênero, em metáfases de seus citótipos irmãos, confirmaram algumas hipóteses. Os cromossomos sexuais presentes em algumas espécies/populações possuem origem múltipla e recente, relacionada a eventos de fusões cromossômicas independentes e acúmulo de heterocromatina.

Estes estudos identificam a microdissecção como uma metodologia confiável e imprescindível para o estudo da composição molecular do DNA de diferentes cromossomos e poderá ser uma ferramenta significativa para o entendimento dos mecanismos relacionados não apenas com o processo evolutivo de cromossomos sexuais, mas também para a descoberta da origem dos cromossomos extras presentes em diversos organismos.

Neste sentido o presente trabalho visou a obtenção de informações sobre a estrutura cromossômica de diferentes espécies de *Characidium* portadoras de cromossomos supranumerários, no sentido de compreender os mecanismos envolvidos no processo de evolução e origem dos cromossomos B presentes nestas espécies. Para tanto, foram utilizados protocolos de técnicas citogenéticas e moleculares, bem como das técnicas de microdissecção e de pintura cromossômica, proporcionando o isolamento e análise de sequências presentes nesses cromossomos, que são compartilhadas com os componentes do complemento A. Tais

informações certamente permitirão uma melhor compreensão da estrutura cromossômica dos peixes e dos mecanismos envolvidos na diferenciação das espécies deste grupo de organismos.

2 Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a estrutura cromossômica dos peixes do gênero *Characidium* que apresentam cromossomos B. Algumas espécies/populações deste grupo apresentam cromossomos B em diferentes estágios de diversificação, que os tornam um modelo instigante para estudos de evolução cromossômica. Nesse contexto, o uso de técnicas citogenéticas e moleculares visaram:

a) ampliar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica deste grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies e populações de *Characidium* que apresentem cromossomos B;

b) aplicar a técnica de hibridação *in situ* fluorescente a partir de sondas específicas para cromossomos supranumerários das populações de *C. gomesi*, *C. oiticicai* e *C. pterostictum*;

c) localizar e mapear os genes de DNA ribossomais 18S e 5S, sequências histônicas H₃ e H₄ nos cromossomos das populações de *C. gomesi*, *C. oiticicai* e *C. pterostictum* que apresentam cromossomos B;

d) produzir informações sobre a estrutura, composição, origem e evolução dos cromossomos B em diferentes espécies de *Characidium*, através do isolamento de sequências cromossomo B específicas (DNAb) e cromossomos A (DNAg) específicas;

e) Caracterizar as sequências DNAb e DNAg isoladas, através do sequenciamento nucleotídico.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para este estudo foram utilizadas amostras de *Characidium* de diferentes localidades, provenientes das bacias hidrográficas do rio Paraguai e das bacias Costeiras do Sudeste, Brasil. Populações de *C. zebra*, *C. gomesi*, *C. lauroi*, *C. alipioi*, *C. lanei*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, que possuem dados citogenéticos conhecidos (Pansonato-Alves et al., 2010, 2011a, 2011b) foram usadas para uma análise filogenética e, para avaliar a origem dos cromossomos B, foram analisadas citogeneticamente quatro populações de *C. gomesi*, cinco populações de *C. pterostictum* e uma população de *C. oiticicai* (Figura 1 e Tabela 1). Os animais foram coletados de acordo com as leis brasileiras de preservação do meio ambiente. Os procedimentos para coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com as regras internacionais em experimentação animal, seguidas pela Universidade do Estado de São Paulo. De cada indivíduo foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e após identificação foram depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP (Tabela 1).

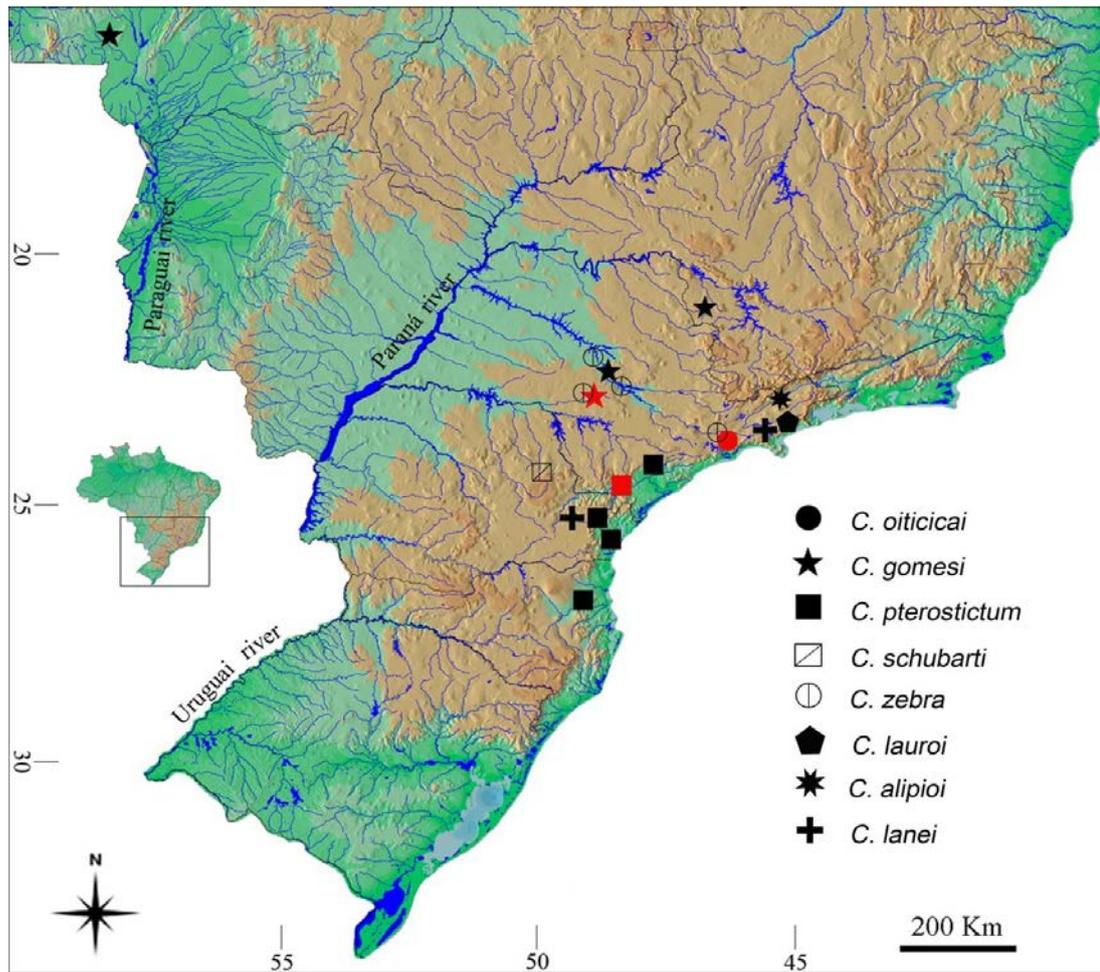


Figura 1 - Mapa indicando as espécies e populações de *Characidium* analisadas no presente estudo. Em vermelho, as populações de *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticai* que apresentaram cromossomos B.

Tabela 1 - Espécies e populações de *Characidium* usadas neste estudo. LBP: Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu. CS: Presença de cromossomos Sexuais. CB: Presença de cromossomos B. Em cinza claro, espécies analisadas citogeneticamente e em cinza escuro, espécies usadas apenas para análise filogenética.

Espécies	LPB	Localidade	CS	CB	Coordenadas
<i>C. pterostictum</i>	16909	Rio Betari – Apiaí – SP	ZW	0-3	24°33'73 S 48°40'16 W
<i>C. pterostictum</i>	6831	Rio Faú – Miracatu – SP	ZW	-	24°12'44 S 47°28'61 W
<i>C. pterostictum</i>	768	Rio Cari – Morretes – PR	ZW	-	25°26'29 S 48°32'28 W
<i>C. pterostictum</i>	8701	Rio Jacareí – Paranaguá – PR	ZW	-	25°32'23 S 48°41'19 W
<i>C. pterostictum</i>	737	Rio Itapocu – Jaraguá do Sul – SC	ZW	-	26°28'25 S 49°10'95 W
<i>C. gomesi</i>	6723	Rio Tietê – Botucatu – SP	ZW	-	22°56'06 S 48°19'18 W
<i>C. gomesi</i>	16908	Cachoeira Véu Noiva – Botucatu – SP	ZW	0-4	23°01'26 S 48°49'32 W
<i>C. gomesi</i>	9021	R. São Domingos – Muzambinho – MG	ZW	-	21°20'47 S 46°28'08 W
<i>C. gomesi</i>	9019	Rio Vermelho – Tangará da Serra – MT	ZW	-	14°35'25 S 57°42'35 W
<i>C. oiticicai</i>	16910	Rio Paraitinguinha – Salesópolis – SP	ZW	0-4	23°30'40 S 45°51'32 W
<i>C. lanei</i>	7898	Rio Indaiá - Ubatuba - SP	ZW	-	25°23'59 S 45°04'07 W
<i>C. lanei</i>	8700	Rio Cari – Morretes – PR	ZW	-	25°26'29 S 48°32'28 W
<i>C. alipioi</i>	8378	Rio Pomba-Sta Bárbara Tugúrio-MG	ZW	-	21°14'79 S 43°34'12 W
<i>C. schubarti</i>	8702	Rio cinco réis – Jaguariaiva – PR	ZW	-	25°17'46 S 49°44'56 W
<i>C. lauroi</i>	8741	Rio Grande – Ubatuba – SP	ZW	-	23°23'42 S 45°07'17 W
<i>C. zebra</i>	8714	Rio Alambari – Botucatu – SP	-	-	22°56'06 S 48°19'18 W
<i>C. zebra</i>	6727	Rio Novo – Avaré – SP	-	-	23°01'26 S 48°49'32 W
<i>C. zebra</i>	8715	Rio Araquá – Botucatu – SP	-	-	22°47'13 S 48°28'89 W
<i>C. zebra</i>	8704	Rio Paraitinguinha – Salesópolis – SP	-	-	23°30'40 S 45°51'32 W



Figura 2 - Exemplos de *Characidium* estudados citogeneticamente no presente trabalho. a) *Characidium pterostictum*, b) *Characidium oiticicai*, c) *Characidium gomesi*. A barra equivale a 1cm.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti et al., 1981), marcação das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizado o método de localização cromossômica de sondas específicas para os cromossomos W e B obtidas por microdissecção e pintura cromossômica, localização do DNAr 18S, DNAr 5S, das histonas H3 e H4 com a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), clonagem e sequenciamento do DNAr 5S e histona H3 a partir do DNA do cromossomo B microdissecado e a partir do DNA genômico, conforme especificado abaixo.

3.2.1 Estimulação de mitoses

Para obtenção de maior número de células em mitose foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por meio da inoculação intramuscular de suspensão de fermento biológico, conforme técnica descrita por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada para peixes por Bertollo et al. (1978) e Oliveira et al. (1988). O procedimento utilizado consiste em:

1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção:

0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;

2) incubar a solução em uma estufa (37 °C) por cerca de 10 minutos;

3) injetar a solução dorso-lateralmente no 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. Fragmentos de tecidos de rins e brânquias foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas visando o estudo cariotípico das espécies.

3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti et al. (1981), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consiste em:

1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;

2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 minutos;

3) sacrificar o animal, retirando o rim e as brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M);

4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até obter uma solução aquosa homogênea;

5) transferir a suspensão obtida para um tubo de centrifuga e deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;

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 min a temperatura ambiente;

7) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 min;

8) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador; centrifugar por 10 min a 1.200 ± 100 rpm;

9) pingar o material em lâminas;

10) deixar secar ao ar.

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

3.2.3 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

Essa técnica caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas. O procedimento foi seguido conforme descrito por Sumner (1972), com adaptações, e consiste em:

1) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2 N por 25 minutos, a temperatura ambiente;

2) lavar com água destilada, a temperatura ambiente;

3) incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60 °C, por 5 a 15 segundos;

- 4) lavar rapidamente em HCl 1 N, a 60 °C, por alguns segundos;
- 5) incubar a lâmina em 2XSSC, a 60 °C, por 25 minutos;
- 6) lavar com água destilada à temperatura ambiente;
- 7) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

3.2.4 Extração de DNA genômico

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

3.2.5 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

3.2.5.1 Microdissecção

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica (Mühlmann et al, 1995) consistiram em:

1. Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente.
2. Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,06M e Na₂HPO₄ 0,449M, pH 6.8) durante 5 minutos.
3. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.

4. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeizz) e proceder a microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf).

5. Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR.

3.2.5.2 Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplifition (WGA4 – Sigma) (Gribble et al., 2004)

Esta reacção consistiu na fragmentação aleatória não enzimática do DNA genómico seguida pela ligação de adaptadores com os dois locais de iniciação de PCR específicos para ambas as extremidades de cada fragmento conforme proposto por Marshall et al. (2004).

Passo 1 - Fragmentação: Adicionar 1 µl da solução *Lysis and Fragmentation Buffer* (0,5 µl de proteinase K + 8 µl de tampão 10x) ao tubo contendo os cromossomos microdissecados. Incubar o mix de DNA a 50 °C por 1 hora, aquecer por exatos 4 minutos a 99 °C, manter no gelo e centrifugar brevemente antes de preparar a biblioteca.

Passo 2 – Preparação da Biblioteca: Para a preparação da biblioteca foram adicionados ao tudo de PCR 2 µl de *Single Cell Library Preparation* e 1 µl de *Library Stabilization Solution*. A amostra foi colocada em termociclador a 95 °C por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1 µl de *Library Preparation Enzyme*, e a amostra foi colocada em termociclador e submetida as seguintes condições:

16°C ----- 20 minutos

24°C ----- 20 minutos

37°C ----- 20 minutos

75°C ----- 5 minutos

4°C ----- manutenção

Passo 3 – Amplificação: Na sequência, foi realizada uma reação de amplificação, adicionando 48,5 µl de água ultrapura, 7,5 µl de *10x Amplification Master Mix* e 5,0 µl de *WGA DNA polimerase*. A amostra foi submetida ao seguinte programa:

95°C ----- 3 minutos

25 ciclos { 94°C ----- 30 segundos
65°C ----- 5 minutos

4°C ----- manutenção

O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%.

3.2.5.3 WGA3- Reamplificação e Marcação

Para cada reação de amplificação foi preparado o seguinte mix de reação:

Água livre de nuclease	15,0 µl
10x Amplification Master Mix	2,5 µl
WGA DNA polimerase	1,7 µl
dNTP (2mM cada)	1,0 µl
dTTP (2mM)	0,3 µl
Digoxigenina dUTP (1mM)	0,7 µl
DNA	2,0 µl

A amostra foi submetida ao seguinte programa:

95°C ----- 3 minutos

14 ciclos { 94°C ----- 15 segundos
65°C ----- 5 minutos

4°C ----- manutenção

O produto da amplificação e marcação foi visualização em gel de agarose 1%.

3.2.5.4 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Characidium zebra*, usando os *primers* 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima *Taq* polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP/ 2 µl de Biotina-16-dUTP, 1µl 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:

94°C ---- 2 min

34 ciclos { 95°C ---- 45 seg
52,1°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 (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Synbranchus marmoratus*, usando os *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima *Taq* polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 de Digoxigenina-11-dUTP/2 µl de Biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl 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

34 ciclos { 95°C ---- 1 min
55°C ---- 45 seg
72°C ---- 1 min

72 °C ---- 7 min

12 °C ---- manutenção

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.5.5 Preparação das sondas para histonas H3 e H4

A sonda de histona H3 foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Characidium zebra*, usando os *primers* H3 F (5' ATG GCT CGT ACC AAG

CAG ACV GC 3') e H3 R (5'ATA TCC TTR GGC ATR GTG AC 3') (Colgan et al., 1998). 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: 34,1 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima *Taq* polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada primer (10mM), 0,4 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

32 ciclos { 95°C ---- 30 seg
54°C ---- 45 seg
72°C ---- 30 seg

72°C ---- 7 min

12 °C ---- manutenção

A sonda de histona H4 foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Characidium zebra*, usando os *primers* H4 F2s (5'TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C 3') e H4 R2r (5' CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT 3') (Pineau et al, 2005). 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). Os parâmetros para marcação foram: 33,5 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima *Taq* polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 1,5 µl de Biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl 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

32 ciclos { 95 °C ---- 30 seg
54 °C ---- 45 seg
72 °C ---- 30 min

72 °C ---- 7 min

12 °C ---- manutenção

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.6 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

O mapeamento das sondas de DNAr 5S e 18S e histonas H3 e H4 em cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

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%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM por 10 minutos a 37 °C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM 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%, 85% e 100% a -20 °C por 5 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%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) contendo 3-6 µL de sonda marcada por 10 minutos a 100 °C. Posteriormente, 15 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, 20xSSC, e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxirodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.2.7 Caracterização do DNAr 5S e histona H3

Sequências de DNAr 5S isoladas do DNA genômico e do cromossomo B microdissecado de exemplares de *C. gomesi*, *C. oiticicai* e *C. pterostictum*, e sequências da histona H3 isoladas do DNA genômico e do cromossomo B microdissecado de exemplares de *C. gomesi* foram clonadas e sequenciadas.

3.2.7.1 Isolamento do DNAr 5S por PCR

O DNAr 5S foi isolado por PCR com o uso dos *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esses primers amplificaram os genes DNAr 5S e seus espaçadores não transcritos (NTS). O mix de PCR utilizado apresentou os seguintes parâmetros: 8,87 µl de água Mili-Q, 0,5 µl de MgCl₂ (25mM), 1,25 ml de Tampão 1, 0,25 µl dNTP mix (2mM), 0,25 µl de cada primer (10mM), 0,12 µl de *Taq* polimerase (5U/µL) e 1,0 µl de DNA molde. Total da reação: 12,5 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95 °C ---- 5 min	
35 ciclos	{	95 °C ---- 1 min 55 °C ---- 45 seg 72 °C ---- 1 min
	72 °C ---- 10 min	
	12 °C ---- manutenção	

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.7.2 Isolamento da histona H3 por PCR

A histona H3 foi isolada por PCR com o uso dos *primers* H3 F (5' ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC 3') e H3 R (5' ATA TCC TTR GGC ATR GTG AC 3') (Colgan et al, 1998). O mix de PCR utilizado apresentou os seguintes parâmetros: 8,9 µl de água Mili-Q, 0,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,25 µl de Tampão (10x) , 0,25 µl dNTP mix (2 mM), 0,25 µl de cada *primer* (2 mM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/µL) e 1,0 µl de DNA molde. Total da reação: 12,5 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95 °C ---- 5 min

30x { 94 °C ---- 15 min
48 °C ---- 15 seg
72 °C ---- 15 seg

72 °C ---- 10 min

12 °C ---- manutenção

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.7.3 Eluição das bandas obtidas pela amplificação por PCR do DNAr 5S e histona H3

Para eluição dos fragmentos de DNA 5S em gel de agarose foi realizado primeiramente um recorte preciso da banda no gel e a eluição foi realizada utilizando o Kit GE – PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Em todos os casos, o DNA foi eluído em maior volume, garantindo uma melhor recuperação do DNA. O produto de eluição foi visualizado em gel de agarose 1% juntamente com marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder, o qual permite a quantificação do DNA e determina o tamanho do inserto.

3.2.7.4 Clonagem das bandas eluídas do DNAr 5S e histona H3

Após a eluição das bandas desejadas, os fragmentos de DNA foram clonados com o Kit TOPO TA (Invitrogen).

O protocolo consistiu em:

1) Ligação com o vetor: Misturar 1 μ l de vetor (plasmídeo pCR2.1TOPO), 1 μ l de solução salina e acrescentar 5 μ l do PCR do fragmento purificado. Incubar por 25 minutos a temperatura ambiente. Colocar no gelo.

2) Transformação: Misturar o vetor (2-4 μ l) + fragmento com 40 μ l de células DH5 α (cepa de Escherichia coli quimicamente competente) em um tubo de 2 á 15ml. Manter em gelo durante 5 a 30 minutos. Submeter o conteúdo a choque térmico (42 °C) por 40 segundos. Acrescentar 250 μ l de meio SOC em temperatura ambiente. Deixar as células crescerem com agitação a 37 °C por uma hora.

Enquanto isso acrescentar 12 μ l de kanamicina (100mg/ml), 40 μ l de X-Gal (20 ng/mL) e 40 μ l de IPTG (100 mM) as placas de petri (com ágar e meio LB) e aquecê-las a 37 °C.

3.2.7.5 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes

Bactérias transformadas foram transferidas para placas de Petri em meio LB/Agar contendo kanamicina e X-gal. As placas foram deixadas na estufa a 37 °C *overnight*. As colônias recombinantes devem ser retiradas com ponteiros estéreis e inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo kanamicina e colocadas para crescer *overnight* com agitação.

3.2.7.6 Extração do DNA plasmidial

Para extração do DNA do plasmídeo foi utilizado o Kit Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System de acordo com a instruções do fabricante.

3.2.7.7 PCR para confirmação da presença de insertos

Para verificar a presença de insertos de interesse nos plasmídeos extraídos dos clones, os produtos da extração de DNA plasmidial foram submetidos a reações de amplificação (PCR) com o uso dos primers M13 F (5' GT AAA ACG ACG GCC AG 3') e M13 R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). O mix de PCR utilizado apresentou a seguinte composição: 9,2 µl de água Mili-Q, 0,25 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,25 µl de Tampão (50 mM), 0,25 µl dNTP mix (2 mM), 0,25 µl de cada primer (10 mM), 0,3 µl de Taq polimerase (5 U/µL) 1 µL de DNA de plasmídeo. Total da reação: 12,75 µl. O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94 °C ---- 2 min
25x	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> { <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <p>94 °C ---- 1 min</p> <p>55 °C ---- 1 min</p> <p>72 °C ---- 1 min</p> </div> </div>
	72 °C ---- 7 min
	12 °C ---- manutenção

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%

3.2.8 Reação de sequenciamento para amostras clonadas do DNAr 5S e H3

Para a realização da reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye Terminosator v1.1 Cycle Sequencing Kit e uma quantidade de DNA correspondente a 10 ng para os fragmentos com tamanho de até 500 pb e 15 ng para os fragmentos entre 500-1000 pb conforme instruções dos próprio Kit. O programa de PCR utilizado apresentou a seguinte composição: 2 µl de Tampão de reação (5X), 0,5 µl de um dos primer (0,1 mM), 1 µl do mix de reação, 0,7 µl de DyeSeq e o suficiente para completar 10 µl de água. Total da reação: 10 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	96 °C ---- 30 seg	
24 ciclos	{	50 °C ---- 30 seg
		60 °C ---- 4 min
		72 °C ---- 1min e 40 seg
	72 °C ---- 10 min	
	4 °C ---- manutenção	

Os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.8.1 Limpeza da reação de sequenciamento

Para a limpeza: Foram adicionados 0,7 µl de EDTA (125 mM) e 0,7 µl de acetato de sódio (3 M), homogeneizados e centrifugados brevemente. Depois, foram acrescentados 17,5 µl etanol 100% gelado, o produto foi homogeneizado e centrifugado brevemente, incubado no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, sendo descartado o sobrenadante em papel toalha. Após batê-lo levemente algumas vezes, foram adicionados 24,5 µl de etanol 70% gelado e o produto foi

centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado em papel toalha e, após batê-lo levemente algumas vezes, foram repetidos os passos de lavagem com etanol 70% novamente. Após secagem em termociclador por 2 minutos a 96 °C, tubos e termo aberto, o conteúdo foi guardado em geladeira coberto por papel alumínio.

3.2.8.2 Sequenciamento

A sequência nucleotídica dos clones recombinantes foi determinada através do BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing de acordo com instruções do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM® 3100GeneticAnalyzer/HITACHI com 96 capilares. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ATGC (Genetix Inc.), BIOEDIT (Hall, 1999) e DAMBE (Xia e Xie, 2001). Para identificação de possíveis homologias, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à busca online BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul et al, 1990) através do National Center for Biotechnology Information - NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson et al, 1997).

Análises de distância genética foram realizadas pelo parâmetro Kimura-2 (Kimura, 1980).

3.2.9 Análises moleculares

3.2.9.1 Análises das sequências obtidas dos cromossomos B microdissecados

As sequências obtidas do DNA microdissecado dos cromossomos B e DNA genômico dos indivíduos 0B, depois de sequenciadas foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência consenso. As sequências contigs foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) disponível online no link <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html> e submetidas ao programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) no dia 05/10/2012 para a busca de similaridades de sequências disponíveis neste banco de dados. As análises de divergência genética foram realizadas com o software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) utilizando o método de Neighbor-Joining e modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

3.2.9.2 Análise de DNA mitocondrial

Foram utilizadas as sequências totais do gene Citocromo B (Cyt B). Para a amplificação e sequenciamento do gene Cyt B foram utilizados os primers Cyt B L 14841 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' e Cyt B H 15915b 5'AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC 3' (Kocher et al, 1989).

Os segmentos gênicos foram obtidos por PCR com uma reação de volume total de 12,5 µl com 35 ciclos (240s a 95 °C, 45s a 48-54 °C, e 60s a 72 °C). Para a PCR foi utilizado o kit Gotaq (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% .As sequências obtidas foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção de sequências *consenso*. As sequências *consenso* foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). A matriz foi particionada em 3 partições, uma para cada posição dos códons. O teste de saturação da matriz foi realizado no programa

DAMBE versão 5.1.1, pelo teste de Xia et. al (2003). A busca do melhor modelo de evolução nucleotídica para cada partição foi realizado no *modeltest* 3.6 (Posada e Crandall, 1998). A análise filogenética pelo método da Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com a ferramenta RAxML-HPC2 on XSEDE (Stamatakis et al, 2008). O teste de bootstrap com 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985) foi utilizado como teste estatístico da filogenia.

3.2.10 Estudos cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais, com fluorocromos e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diploide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime) presente em cada espécie/população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos), coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho para a montagem dos kariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan et al. (1964).

4 Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies de *Characidium* foram organizados na forma de dois capítulos, que são apresentados a seguir.

Capítulo 1

Origem única para cromossomos sexuais e origens múltiplas para cromossomos B em peixes do gênero *Characidium*.

Capítulo 2

Sequências históricas e de DNAr 5S em cromossomos B indicam origem independente destes elementos genômicos em espécies do gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae).

Capítulo 1

Origem única para cromossomos sexuais e origens múltiplas para cromossomos B em peixes do gênero *Characidium*

Resumo

Os peixes do gênero *Characidium* caracterizam-se como um interessante modelo para estudos citogenéticos e evolutivos, por apresentarem diferentes particularidades genômicas, ao mesmo tempo em que exibem uma macroestrutura cariotípica conservadora. Neste grupo, apesar do número diploide de 50 cromossomos ser conservado em todas as espécies analisadas, diferenças interespecíficas e interpopulacionais são observadas, principalmente em relação aos cromossomos sexuais e a cromossomos B. Neste estudo, hipóteses de relacionamento filogenético e evolução cariotípica foram investigadas usando em conjunto técnicas citogenéticas e moleculares. Análises citogenéticas, envolvendo pintura cromossômica, com sondas para cromossomos B e sexuais, foram realizadas em populações de *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* com e sem cromossomos B. Adicionalmente, uma hipótese de relacionamento filogenético foi estabelecida para posicionar estas populações analisadas, utilizando ainda outras cinco espécies de *Characidium* com dados citogenéticos conhecidos. Os resultados obtidos confirmam que os cromossomos ZW possuem uma origem única neste grupo, enquanto os cromossomos B possuem dois tipos de origem. Em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, os cromossomos B apresentam origem intra específica, possivelmente relacionada aos cromossomos sexuais. No entanto, estes cromossomos B têm origens independentes, considerando o posicionamento destas espécies na filogenia estabelecida. Por outro lado, os cromossomos B de *C. oiticicai* apresentam uma origem interespecífica, possivelmente relacionada a algum tipo de hibridação introgressiva. Estes resultados evidenciam que a integralização de abordagens cromossômicas, moleculares e filogenéticas caracterizaram-se como ferramentas significativas para uma melhor compreensão do processo de origem dos cromossomos B em espécies de *Characidium*.

Introdução

Cromossomos B são elementos extras encontrados em muitos genomas eucariotos, em adição aos cromossomos do complemento padrão A. Geralmente são compostos de sequências de DNA altamente repetitivas, especialmente DNA ribossômico, DNA satélite e elementos móveis (Camacho, 2005), sendo escassos registros de cromossomos B portando sequências codificantes (Graphodatsky et al, 2005). Em muitos grupos, a origem destes cromossomos está relacionada ao genoma de outras espécies (origem interespecífica), porém em outros, sua origem está relacionada ao seu próprio genoma (origem intra específica) (Camacho et al, 2000). Nos casos de origem intra específica, cromossomos B podem originar-se tanto de cromossomos autossômicos, como em *Locusta migratoria* (Teruel et al, 2010) ou a partir de cromossomos sexuais, como no sapo *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel et al, 1998) e no peixe *Lithocromis rubripinnis* (Yoshida et al, 2011). Em comparação, cromossomos sexuais e cromossomos B podem apresentar estreita semelhança, principalmente quanto à distribuição da cromatina, acúmulo de DNA repetitivo e perda de atividade gênica (Camacho et al, 2000).

Em peixes, a presença de cromossomos B já foi descrita para diversas espécies (Ziegler et al, 2003; Oliveira et al, 2007, Poletto et al, 2010; Yoshida et al, 2011; Fantinatti et al, 2012, entre outros). Morfologicamente, estes cromossomos se apresentam muito variáveis, desde muitos pequenos, como em *Moenkhausia sanctafilomenae* (Foresti et al, 1989) e *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983) até muito grandes, como em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al, 2000) e *Alburnus alburnus* (Ziegler et al, 2003). Em alguns casos, sequências repetitivas presentes em cromossomos B são compartilhadas com cromossomos autossômicos, como em *P. lineatus* (Artoni et al, 2006; Jesus et al, 2003) e *A.*

scabripinnis (Vicari et al, 2011). Em outros, são encontrados sequências repetitivas específicas destes cromossomos B, como em *A. alburnus* (Ziegler et al, 2003).

Dentre os peixes Neotropicais, o gênero *Characidium*, família Crenuchidae, caracteriza-se como um interessante modelo para estudos citogenéticos e evolutivos, devido principalmente à presença de um diversificado sistema de cromossomos sexuais (Vicari et al, 2008), bem como de cromossomos supranumerários (Miyazawa e Galetti, 1994; Venere et al, 1999; Pansonato et al, 2010 e 2011a). Neste grupo, apesar do número diploide de 50 cromossomos ser conservado em todas as espécies analisadas (Pansonato-Alves et al, 2010), diferenças interespecíficas e interpopulacionais são observadas, tanto em relação aos cromossomos sexuais do tipo ZZ-ZW (Machado et al, 2011), como em relação a localização e número de sítios de DNAr (Vicari et al, 2008), ocorrência de triploidia natural (Centofante et al, 2001; Pansonato-Alves et al, 2011b) e presença de cromossomos B (Miyazawa e Galetti Jr, 1994; Pansonato-Alves et al, 2010 e 2011a).

Em *Characidium*, tem sido postulado que o sistema de cromossomos sexuais apresenta uma origem comum e que as diferenças fenotípicas entre os cromossomos Z e W em diferentes espécies e populações foram ocasionadas por uma série de rearranjos estruturais, envolvendo principalmente sítios de DNAr e regiões heterocromáticas (Machado et al, 2011). Ainda, a despeito de a maioria das espécies apresentar apenas um par cromossômico portador de RONS, estes elementos possuem grande mobilidade no genoma deste grupo (Machado et al, 2011). Neste cenário, algumas espécies e populações se destacam ainda mais, pois se apresentam altamente diferenciadas, como (i) a população de *C. gomesi* da Cachoeira Vêu de Noiva, que possui células com até quatro cromossomos B e não possui DNAr nos cromossomos sexuais (Maistro et al, 2004); (ii) a população de *C. gomesi* do rio Tietê, que possui DNAr nos cromossomos Z e W e não possui cromossomos B (Pansonato-Alves et al, 2011a); (iii) a população de *C. oiticicai* do rio Paraitinga, que possui células com

até 3 pequenos cromossomos extras e RONS nos braços longos do cromossomo W e nos braços curtos do cromossomo Z (Pansonato-Alves et al, 2010) e (iv) uma população de *C. pterostictum* do rio Betari, que apresenta células com até 3 pequenos cromossomos B, RONS nos braços longos do cromossomo W e nos braços curtos Z, além de um par acrocêntrico exclusivo desta espécie (Pansonato-Alves et al, 2010). Em nenhuma destas populações, sítios de RONS ativos foram encontrados em cromossomos B (Pansonato-Alves et al, 2010, 2011a).

Considerando a escassez de informações quanto à constituição e origem de cromossomos B em peixes Neotropicais, bem como as características cromossômicas particulares observadas em representantes do gênero *Characidium*, desenvolvemos este trabalho com o objetivo de investigar a origem dos cromossomos extras em espécies e populações deste grupo de peixes, através de inferências de posicionamento filogenético entre as espécies e pintura cromossômica com sondas específicas para os cromossomos B e para o cromossomo sexual W. Os dados obtidos sugerem a ocorrência de origens distintas para cromossomos supranumerários dentro de um mesmo gênero e a apontam para participação de cromossomos sexuais no processo de formação de elementos genômicos extras em espécies de peixes Neotropicais.

Material e Métodos

Origem das amostras e análise citogenética

Para este estudo, foram utilizadas amostras de *Characidium* de diferentes localidades, provenientes das bacias hidrográficas do rio Paraguai e das bacias Costeiras do Sudeste, Brasil. Populações de *C. zebra*, *C. gomesi*, *C. lauroi*, *C. lanei*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, que possuem dados citogenéticos conhecidos (Pansonato-Alves et al, 2010, 2011a, 2011b), foram usadas para uma análise filogenética e, para avaliar a origem dos cromossomos B, foram analisadas citogeneticamente quatro populações de *C. gomesi*, cinco populações de *C. pterostictum* e uma população de *C. oiticicai*. Para análise filogenética, foi analisada também uma população de *Crenuchus spilurus*, usada como grupo externo (Figura 1 e Tabela 1). Os animais foram coletados de acordo as leis brasileiras de preservação do meio ambiente (permissão de coleta MMA/IBAMA/SISBIO - número 3245). Os procedimentos para coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com as regras internacionais em experimentação animal, seguidas pela Universidade do Estado de São Paulo (Protocolo CEEAA/IBB/UNESP - número 304). Os animais foram anestesiados, dissecados e as preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti et al. (1981). O bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972). Os exemplares analisados foram identificados, fixados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 1).

Microdissecção e FISH

Para a microdissecção dos cromossomos B foram utilizadas suspensões de células de *C. gomesi* (Cachoeira Véu de Noiva – número de registro 33637), *C. pterostictum* (rio Betari – número de registro 37903) e *C. oiticicai* (rio Tietê – número de registro 31212) cujas metáfases possuíam apenas um cromossomo B e para a microdissecção do cromossomo W foi usada suspensão celular de *C. gomesi* (rio Tietê - número de registro 31099). Os cromossomos B foram facilmente identificados por apresentarem tamanho reduzido e morfologia distinta dos demais cromossomos do complemento A (Figura 2b, c, d), enquanto o cromossomo W da população de *C. gomesi* do rio Tietê apresenta constrição secundária em seus braços longos (Figura 2a). As suspensões celulares foram gotejadas em lamínulas de vidro 24 mm x 60 mm e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos e a microdissecção foi realizada utilizando-se um micromanipulador com agulha de vidro (5171-Eppendorf), acoplado a um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss). Foram microdissecados 10 cromossomos B de cada população e 12 cromossomos W de *C. gomesi* (Tietê). Estes cromossomos foram colocados em 4 diferentes microtubos (0,2 mL) com 9 µL de água ultrapura, sendo o DNA amplificado com o Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4 – Sigma) (Gribble et al, 2004). Após a reação, os produtos foram visualizados em gel de agarose. Com o DNA amplificado, foram geradas sondas para os cromossomos B (CgB – *C. gomesi*, CpB – *C. pterostictum*, CoB – *C. oiticicai*) e para o cromossomo W (CgW – *C. gomesi*) a partir de uma reação de reamplificação destes DNAs com o Kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit (WGA3 – Sigma) associado com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science).

Experimentos de hibridação *in situ* (FISH) com sondas para os cromossomos B foram realizados em dois exemplares machos e em dois exemplares fêmeas portadores de

cromossomos B de cada espécie analisada e em um exemplar macho e um exemplar fêmea 0B. FISH com sonda para o cromossomo sexual W foi realizado em um exemplar fêmea portador de cromossomo B e em um exemplar fêmea 0B de cada espécie. O procedimento de hibridação *in situ* adotado seguiu o protocolo estabelecido por Pinkel et al. (1986), usando estrigência de 77%, sendo os cromossomos contracolorados com 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando-se o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics) e trabalhadas no programa Adobe Photoshop CS2 para controle de brilho e contraste.

Análise de DNA mitocondrial

Para extração do DNA foi utilizado o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante. Para a análise molecular foram utilizadas as sequências totais do gene Citocromo B (Cyt B). Para a amplificação e sequenciamento do gene Cyt B foram utilizados os primers Cyt B L 14841 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' e Cyt B H 15915b 5'AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC 3' (Kocher et al, 1989).

Os segmentos gênicos foram obtidos por PCR com uma reação de volume total de 12,5 µl com 35 ciclos (240s a 95 °C, 45s a 48-54 °C, e 60s a 72 °C). Para a PCR foi utilizado o kit Gotaq (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% e purificados usando ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, esses produtos foram usados para montar reações de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), submetido ao programa presente no manual do kit. As

reações foram purificadas e as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. As sequências obtidas foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção de sequências *consenso*. As sequências *consenso* foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). A matriz foi particionada em 3 partições, uma para cada posição dos códons. O teste de saturação da matriz foi realizado no programa DAMBE versão 5.1.1, pelo teste de Xia et Al. (2003). A busca do melhor modelo de evolução nucleotídica para cada partição foi realizado no *modeltest* 3.6 (Posada e Crandall, 1998). A análise filogenética pelo método da Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com a ferramenta RAxML-HPC2 on XSEDE (Stamatakis et al, 2008). O teste de bootstrap com 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985) foi utilizado como teste estatístico da filogenia.

Análise estatística

Para testar a presença de cromossomos B ligada ao sexo dos indivíduos aqui analisados, foi realizado o teste de associação do χ^2 , através do software GraphPad PRISM 5.1, considerando um valor de α de 0,05; e as significâncias estatísticas com um *P*-value menor ou igual a 0,05.

Resultados

O cariótipo padrão consiste de 50 cromossomos (cromossomos A) em todas as espécies de *Characidium* até então analisadas. Três espécies, no entanto, também apresentam cromossomos B mitoticamente instáveis, cujo número varia entre células dentro de um mesmo indivíduo. Em todas estas três espécies, cromossomos B foram os menores membros do cariótipo. Estas espécies foram *C. gomesi* e *C. oiticicai*, que mostram 32 metacêntricos (m)

e 18 submetacêntricos (sm) cromossomos A, e *C. pterostictum* com 32 m, 16 sm e 2 acrocêntricos (a) cromossomos A. Todas estas três espécies apresentam sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais, da mesma forma que as demais espécies de *Characidium* analisadas, com a única exceção sendo *C. zebra* (Tabela 1).

Uma das quatro populações de *C. gomesi* amostradas, proveniente da Cachoeira Vêu de Noiva, evidenciou a presença de cromossomos B em 21 dos 25 indivíduos analisados, com os indivíduos que transportam B apresentando de 0-4 cromossomos B (Tabela 2). Os indivíduos analisados provenientes dos rios do Alambari, São Domingos e Vermelho, no entanto, não apresentaram cromossomos B. Em *C. pterostictum*, 6 indivíduos dos 18 analisados do rio Betari apresentaram células com 0-2 cromossomos B (Tabela 2), enquanto que as populações de Miracatu, Paranaguá, Morretes e Jaraguá do Sul não apresentaram cromossomos B. A única população de *C. oiticicai* analisada, proveniente do rio Paraitinga, apresentou 7 dos 10 indivíduos com células com 0-4 cromossomos B (Tabela 2).

As análises estatísticas de associação de χ^2 para avaliar a presença dos cromossomos B ligada ao sexo evidenciaram diferenças estatisticamente significativas somente para *C. gomesi* ($P < 0,0092$), no qual nas fêmeas foi observada uma maior frequência de cromossomos B em comparação as espécies restantes.

A técnica de bandamento C revelou padrões muito semelhantes nas três espécies, especialmente para os cromossomos W e B, que se mostraram completamente heterocromáticos em todas as três espécies (Figura 2). O cromossomo Z mostrou um grande bloco de heterocromatina pericentromérica em todas as populações de *C. gomesi* e *C. oiticicai*, além um bloco adicional distal para *C. pterostictum*. Os autossomos apresentaram blocos heterocromáticos em posição pericentromérica em todas as três espécies, mas em *C. pterostictum*, foram evidenciados também blocos distais no braço curto do par submetacêntrico número 22 e no braço longo do par acrocêntrico 25.

A pintura cromossômica intraespecífica com as sondas obtidas a partir dos cromossomos B microdissecados mostrou diferenças marcantes entre as espécies. Em *C. gomesi*, a sonda CgB hibridiza sobre os cromossomos B, bem como na região pericentromérica do cromossoma Z e em todo o cromossomo W (Figura 3a-d). Em *C. pterostictum*, a sonda CpB hibridizou sobre os cromossomos B, na região distal do braço longo do cromossomo Z, em todo cromossomo W e na região distal do par acrocêntrico número 25 (figura 4a-d). Finalmente, em *C. oiticicai*, a sonda CoB hibridizou apenas nos cromossomos B (Figura 5a-b).

A pintura cromossômica interespecífica com a sonda CgB mostrou sinais de hibridação nos cromossomos B, Z, W e no par acrocêntrico autossômico número 25 em *C. pterostictum*, mas apenas em cromossomas sexuais em *C. oiticicai* (Figura 3e-h). A sonda CpB mostrou sinais de hibridação sobre os cromossomos sexuais e sobre o cromossomo B em *C. gomesi*, mas apenas nos cromossomos sexuais em *C. oiticicai* (Figura 4e-h). Em contraste, a sonda CoB não mostrou qualquer sinal de hibridação nos cromossomos de *C. gomesi* e *C. pterostictum* (Figura 5, Tabela 5). Finalmente, as experiências utilizando a sonda CgW produziu os mesmos resultados que os obtidos com as sondas CgB e CpB (Figura 6a-h).

A análise da sequência do Citocromo B do DNA mitocondrial incluiu um total de 1.130 nucleotídeos, 416 deles sendo variáveis e 318 informativos para análise de parcimônia. O teste de saturação evidenciou que os dados não se encontram saturados. A análise da topologia gerada por ML (Figura 7) evidenciou a existência de dois grupos estatisticamente bem sustentados, um deles incluindo todas as populações de *C. zebra* (espécie sem cromossomos sexuais) e o outro grupo incluindo todas as espécies restantes (todas apresentando cromossomos sexuais). Estes dados sugerem uma origem comum e única para os cromossomos sexuais nestas espécies. Adicionalmente, esta topologia mostra que *C. gomesi* pertence a um clado distante dos clados onde *C. pterostictum* e *C. oiticicai* foram

incluídos. Estas duas últimas espécies, por sua vez, apresentam maior semelhança filogenética. Estes resultados indicam que os cromossomos B em *C. gomesi* e em *C. pterostictum* têm origens presumivelmente independentes, apesar da alta similaridade no conteúdo do DNA mostrado pela pintura cromossômica.

Discussão

O conjunto cromossômico padrão identificado em todas as populações de *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* é composto por 50 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico e por um sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais, confirmando a estabilidade da macroestrutura cariotípica deste grupo de peixes (Vicari et al, 2008). No entanto, os cromossomos B identificados caracterizam-se como polimorfismos exclusivos de algumas populações e confirmam que, a despeito de um cariótipo estável, este grupo apresenta significativa variabilidade cromossômica, inclusive em nível populacional (Machado et al, 2011). Por outro lado, esta variabilidade relacionada à presença de cromossomos B não ocorre com grande frequência neste grupo e não apresenta predisposição para ocorrer em uma espécie específica, tendo em vista que, de oito espécies de *Characidium* com dados citogenéticos conhecidos, uma população de *C. gomesi* (nove populações analisadas), uma população de *C. pterostictum* (cinco populações analisadas), uma população de *C. zebra* (sete populações analisadas) e uma população de *C. oiticicai* (uma analisada) apresentaram cromossomos B (Miyazawa e Galetti Jr, 1994; Centofante et al, 2001; 2003; Silva e Maistro, 2006; Pansonato-Alves et al, 2010; 2011a e Machado et al, 2011). Ainda, os cromossomos B observados nestas populações possuem características distintas, principalmente em relação à morfologia e a distribuição da heterocromatina (Miyazawa e

Galetti Jr, 1994; Pansonato-Alves et al, 2011a), demonstrando que mecanismos de diferenciação parecem estar agindo de modo intenso nestes elementos genômicos.

Os sinais de hibridação observados em todos os experimentos indicam que as sondas obtidas a partir dos cromossomos B e W de *Characidium* estão saturadas com sequências repetitivas. No entanto, o DNA repetitivo evidenciado por estas sondas está presente apenas em regiões de alguns cromossomos específicos, apontando para a existência de, ao menos, três tipos de DNA repetitivo no genoma das espécies estudadas. Um primeiro tipo estaria relacionado aos cromossomos B e aos sexuais de *C. gomesi*, bem como aos cromossomos B, aos sexuais e a um par autossômico de *C. pterostictum* e também aos sexuais de *C. oiticicai*. Um segundo tipo estaria restritamente relacionado à heterocromatina presente nos cromossomos B de *C. oiticicai* e uma terceira categoria estaria relacionada à heterocromatina presente nos demais cromossomos autossômicos das três espécies. Tais resultados não excluem a possibilidade de existirem outras sequências de DNA repetitivo distribuídas no genoma destas espécies.

As sondas produzidas para os cromossomos B da população de *C. gomesi* da Cachoeira Véu de Noiva, para o cromossomo B de *C. pterostictum* do rio Betari e para o cromossomo W de *C. gomesi* do rio Tietê apresentaram os mesmos padrões de hibridização, indicando que elas são formadas pelos mesmos tipos de DNA repetitivo. No entanto, a sonda produzida para o cromossomo W contém DNAr e não foram observados sinais de hibridação em posição distal do par autossômico 17 (portador de DNAr) da população de *C. gomesi* da Cachoeira Véu de Noiva (Figura 6d). Este resultado pode ser explicado pelo fato de, no procedimento de amplificação realizado (GenomePlex), não se ter conseguido uma representação total do DNA deste cromossomo, como discutido para *Eyprepocnemis plorans*, no qual duas sondas para o cromossomo X produzidas pela mesma metodologia de amplificação (GenomePlex), apresentaram padrões ligeiramente divergentes de hibridação

(Teruel et al, 2009). Por outro lado, no presente estudo, as sondas hibridaram principalmente sobre a heterocromatina dos cromossomos sexuais e dos B, que são regiões DAPI positivas, indicando que, regiões ricas em AT podem ter sido mais bem representadas do que outras regiões, como as RONS, ricas em GC, como já discutido por Teruel et al. (2009).

Os resultados apresentados pela pintura cromossômica em *C. gomesi* da Cachoeira Vêu de Noiva e *C. pterostictum* do rio Betari demonstram que os cromossomos B existentes nestas populações, assim como em *P. lineatus* e *A. scabripinnis* (Artoni et al, 2006; Vicari et al, 2011), compartilham sequências de DNA com cromossomos do complemento A, sugerindo a ocorrência de origem intraespecífica. No entanto, em *Prochilodus* e *Astyanax*, não são observados cromossomos sexuais heteromórficos, ao passo que, nas populações analisadas, os cromossomos B compartilham os mesmos segmentos heterocromáticos presentes nos cromossomos sexuais. O compartilhamento de sequências de DNA entre cromossomos B e cromossomos sexuais caracteriza-se como uma situação já observada em representantes de muitos grupos, como nos gafanhotos *Podisma sapporensis* (Bugrov et al, 2003), *Locusta migratoria* (Teruel et al, 2009), *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al, 1994, Teruel et al, 2009), no anfíbio *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel et al, 1998), no roedor *Apodemus peninsulae* (Matsubara et al, 2008) e no peixe *Lithochromis rubripinnis* (Yoshida et al, 2011). No entanto, na maioria destes casos, sequências entre cromossomos B e sexuais são também compartilhadas com cromossomos do complemento autossômico, impossibilitando exatidão quanto ao cromossomo de origem. Um exemplo fortemente indicativo de origem de cromossomos B a partir dos sexuais é no anfíbio *Leiopelma hochstetteri*, onde também as semelhanças morfológicas entre os cromossomos B e o W são confirmadas pelas análises de sequências de DNA (Green et al, 1993; Sharbel et al, 1998). Em *C. gomesi* e em *C. pterostictum*, apesar de os dados indicarem uma origem diretamente relacionada aos

cromossomos sexuais, informações adicionais são necessárias para comprovar esta hipótese de modo consistente.

Em *C. pterostictum*, sinais de hibridação com as sondas CpB, CgB e CgW foram observados nos cromossomos B, nos sexuais e nos blocos heterocromáticos do par autossômico 25 (acrocêntrico). A presença deste par acrocêntrico em *C. pterostictum* e seu processo de formação poderiam representar um mecanismo pelo qual os cromossomos B se originaram na população do rio Betari. No entanto, todas as espécies e populações de *Characidium* com dados citogenéticos conhecidos apresentam $2n=50$, constituídos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Pansonato-Alves et al, 2010). Considerando os dados citogenéticos apresentados neste estudo, a distribuição geográfica de *C. pterostictum* (Buckup e Reis, 1997) e a posição filogenética destas amostras (Figura 7), pode se hipotetizar que o par acrocêntrico destas populações é uma característica derivada em *Characidium* e, até então, exclusiva desta espécie. A formação deste cromossomo poderia, inclusive, pré-datar o processo de especiação.

O fato dos pares acrocêntricos compartilharem sequências com cromossomos os sexuais em populações que não apresentam B (Miracatu, Morretes, Paranaguá e Jaraguá do Sul), indica que essas sequências se estabeleceram neste par antes de estarem nos cromossomos B, que são exclusivos da população do rio Betari. Neste sentido, os cromossomos B desta população teriam surgido em um evento mais recente, também relacionado aos cromossomos sexuais, pois compartilham sequências com os cromossomos B e sexuais de *C. gomesi* e com os sexuais de *C. oiticicaí*. No entanto, considerando que regiões portando sequências de DNA repetitivas estão suscetíveis a uma intensa dinâmica evolutiva, que poderia gerar milhares de cópias parálogas no genoma, o resultado da pintura cromossômica neste par acrocêntrico poderia estar sustentando uma falsa ideia de homologia

com os cromossomos B e os sexuais. Considera-se, portanto, que outros estudos envolvendo a microdissecção deste par acrocêntrico, poderiam levar ao esclarecimento desta questão.

A árvore filogenética obtida revelou a existência de duas linhagens, compreendendo um grupo sem cromossomos sexuais (formado pelas populações de *C. zebra*) e outro grupo com cromossomos sexuais (formado pelas demais espécies). O fato das populações com cromossomos B estarem bem relacionadas a populações sem cromossomos B (Figura 7) representa uma forte evidência de que os cromossomos B de *C. gomesi* e *C. pterostictum* apresentam origens independentes, mas regidas, provavelmente, pelo mesmo mecanismo e em momentos distintos, uma vez que este elemento supranumerários compartilham sequências entre si e com os cromossomos sexuais. Contudo os cromossomos B apresentados pelos representantes de *C. oiticicai* não compartilham sequências com os cromossomos B existentes nas populações de *C. gomesi* e *C. pterostictum*, apontando também para uma origem independente. E, neste caso, o fato deste elemento extra também não compartilha sequências com nenhum cromossomo do seu conjunto A, sugere que, além de independente, este cromossomo possa ter uma origem interespecífica, como já foi encontrado em vespas do gênero *Nasonia* (McAllister e Werren, 1997; Perfectti e Werren, 2001) e no peixe *Poecilia formosa* (Schartl et al, 1995). Em *Nasonia vitripennis*, dados da filogenia molecular de um elemento retrotransponível indicam que cópias do seu PSR (*paternal sex ratio*) cromossomo B são mais similares a espécies de um gênero diretamente relacionado, *Trichomalopsis*, apontando para uma origem interespecífica (McAllister e Werren, 1997). No presente estudo, os cromossomos B presentes em *C. oiticicai* e *C. pterostictum* são muito similares, em tamanho e padrões de heterocromatinização. No entanto, a pintura cromossômica com todas as sondas produzidas, indica que o cromossomo B de *C. oiticicai* apresenta uma constituição gênica distinta em relação aos cromossomos B das outras espécies, inclusive de *C. pterostictum*. Tal situação também já é observada nas vespas *N. vitripennis* e em

Trichogramma kaykai (Van Vugt et al, 2009). Estas vespas apresentam um PSR cromossomo B muito similar em seu modo de ação, mas com origens distintas. A análise de sequências de ITS₂ do cromossomo B de *Trichogramma* não indica semelhanças com as sequências de ITS₂ de *N. vitripennis*. Por outro lado, os elementos móveis específicos do cromossomo B de *N. vitripennis* (McAllister e Werren, 1997) não são localizados nos cromossomos B de *T. kaykai*, sugerindo que ambos os cromossomos extras destas vespas têm diferentes composições e distintas origens (Van Vugt et al, 2012). Considera-se, pois, que uma análise detalhada da estrutura cariotípica de amostras de *C. zebra*, que vivem em simpatria com *C. oiticicai*, bem como de amostras de *C. lauroi*, espécies diretamente relacionada (Figura 7), certamente deverá contribuir para a identificação da existência de algum tipo de hibridação introgressiva ocorrido, bem como para o esclarecimento do processo de formação dos cromossomos B nesta espécie.

Embora o objetivo do presente estudo fosse avaliar a origem dos cromossomos B em espécies de *Characidium*, os resultados obtidos pela pintura cromossômica com as sondas CgW, GgB e CpB demonstram que o DNA repetitivo presente nos cromossomos ZW é altamente conservado entre as espécies e populações analisadas. Adicionalmente, a reconstrução filogenética indica que este sistema sexual é compartilhado por um amplo grupo de espécies, com grande distribuição geográfica (Vicari et al, 2008; Noletto et al, 2009; Pansonato-Alves et al, 2010; Machado et al, 2011). Tais resultados são significativos para apontar a condição monofilética deste grupo e a origem única para os cromossomos sexuais, como ocorre com peixes do gênero *Triportheus*, no qual a presença de um sistema sexual ZW tem sido observada em todas as espécies analisadas (Artoni et al, 2002). Por outro lado, outros gêneros de peixes Neotropicais apresentam situação oposta, como *Eigenmannia*, no qual são observados diferentes sistemas sexuais em espécies próximas, possivelmente com origens distintas e recentes (Henning et al, 2011). A análise citogenética e filogenética de mais

representantes de *Characidium*, inclusive de espécies de outros gêneros próximos, bem como a produção de sondas para o cromossomo Z, mais conservado do que o W, poderá oferecer significativas informações sobre os mecanismos de evolução dos cromossomos sexuais em peixes Neotropicais.

Os dados obtidos nesta análise apontam que cromossomos B em espécies e populações de *Characidium* possuem origens independentes, intraespecífica em *C. gomesi* e *C. pterostictum* e interespecífica em *C. oiticicai*. Segundo Camacho et al. (2011) a ferramenta mais apropriada para revelar a origem de cromossomos extras é a comparação de sequências de DNA entre cromossomos A e B. Neste sentido, o estudo das sequências presentes nestes cromossomos B, isoladas por microdissecção, comparadas com sequências específicas dos cromossomos A, representarão uma abordagem eficiente para confirmar a origem dos cromossomos supranumerários neste grupo de peixes Neotropicais.

Referências

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

Tabela 1 - Espécies e populações de *Characidium* usadas neste estudo. LBP: Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu. CS: Presença de cromossomos Sexuais. CB: Presença de cromossomos B. Em cinza claro, espécies analisadas citogeneticamente e em cinza escuro, espécies usadas apenas para análise filogenética.

Espécies	LBP	Localidade	CS	CB	Coordenadas	
<i>C. pterostictum</i>	7367	Rio Betari – Apiaí – SP	ZW	0-3	24°33'73 S	48°40'16 W
<i>C. pterostictum</i>	6831	Rio Faú – Miracatu – SP	ZW	-	24°12'44 S	47°28'61 W
<i>C. pterostictum</i>	768	Rio Cari – Morretes – PR	ZW	-	25°29'19 S	48°49'97 W
<i>C. pterostictum</i>	8701	Rio Jacareí – Paranaguá – PR	ZW	-	25°32'23 S	548°4'19 W
<i>C. pterostictum</i>	737	Rio Itapocu – Jaraguá do Sul – SC	ZW	-	26°28'25 S	49°10'95 W
<i>C. gomesi</i>	6723	Rio Tietê – Botucatu – SP	ZW	-	22°56'06 S	48°19'18 W
<i>C. gomesi</i>	6733	Cachoeira Véu Noiva – Botucatu-SP	ZW	0-4	23°01'26 S	48°49'32 W
<i>C. gomesi</i>	9021	Rio São Domingos – Muzambinho – MG	ZW	-	21°20'47 S	46°28'08 W
<i>C. gomesi</i>	9019	Rio Vermelho – Tangará da Serra – MT	ZW	-	14°35'25 S	57°42'35 W
<i>C. oiticicaei</i>	8730	Rio Paraitinguinha – Salesópolis – SP	ZW	0-3	23°30'40 S	45°51'32 W
<i>C. lanei</i>	7898	Rio Indaiá - Ubatuba – SP	ZW	-	23°23'59 S	45°04'07 W
<i>C. lanei</i>	8700	Rio Cari – Morretes – PR	ZW	-	25°29'19 S	48°49'97 W
<i>C. schubarti</i>	8702	rio Cinco Réis – Jaguariaiva – PR	ZW	-	25°27'46 S	49°44'56 W
<i>C. lauroi</i>	8741	rio Grande – Ubatuba – SP	ZW	-	23°23'42 S	45°07'17 W
<i>C. zebra</i>	8714	Rio Alambari – Botucatu – SP	-	-	22°56'06 S	48°19'18 W
<i>C. zebra</i>	6727	Rio Novo – Avaré – SP	-	-	23°01'26 S	48°49'32 W
<i>C. zebra</i>	8715	Rio Araquá – Botucatu – SP	-	-	22°47'13 S	48°28'89 W
<i>C. zebra</i>	6732	Rio Paraitinguinha – Salesópolis – SP	-	-	23°30'40 S	45°51'32 W

Tabela 2 - Polimorfismos de cromossomos B em populações de *Characidium*. *Exemplares*: Número de machos (M) e fêmeas (F) analisadas. *Prevalência*: Porcentagem de exemplares, total e por sexo, portando cromossomos B.

Espécie/População	Exemplares	Número de exemplares com até:					Prevalência
		0B	1B	2B	3B	4B	
<i>C. gomesi</i> /Cachoeira Véu Noiva	19 F	1	7	7	3	1	94,73%
	06 M	3		2	1		50,00%
	25 Total	4	7	9	4	1	84,00%
<i>C. pterostictum</i> /rio Betari	11 F	8	3				27,27%
	07 M	4	2	1			42,85%
	18 Total	12	5	1			33,33%
<i>C. oiticicai</i> /rio Paraitinga	06 F	3	2			1	50,00%
	04 M		3	1			100,00%
	10 Total	3	5	1			70,00%

Tabela 3 - Síntese dos experimentos de hibridação *in situ* com sondas para os cromossomos B e W obtidas por microdissecção em *Characidium*.

Espécie	Cromossomo	Pintura Cromossômica			
		Sonda W - CgW	Sonda B - CgB	Sonda B - CpB	Sonda B - CoB
<i>C. gomesi</i>	B	+	+	+	-
	Z	+	+	+	-
	W	+	+	+	-
	A	-	-	-	-
<i>C. pterostictum</i>	B	+	+	+	-
	Z	+	+	+	-
	W	+	+	+	-
	A	+	+	+	-
<i>C. oiticicai</i>	B	-	-	-	+
	Z	+	+	+	-
	W	+	+	+	-
	A	-	-	-	-

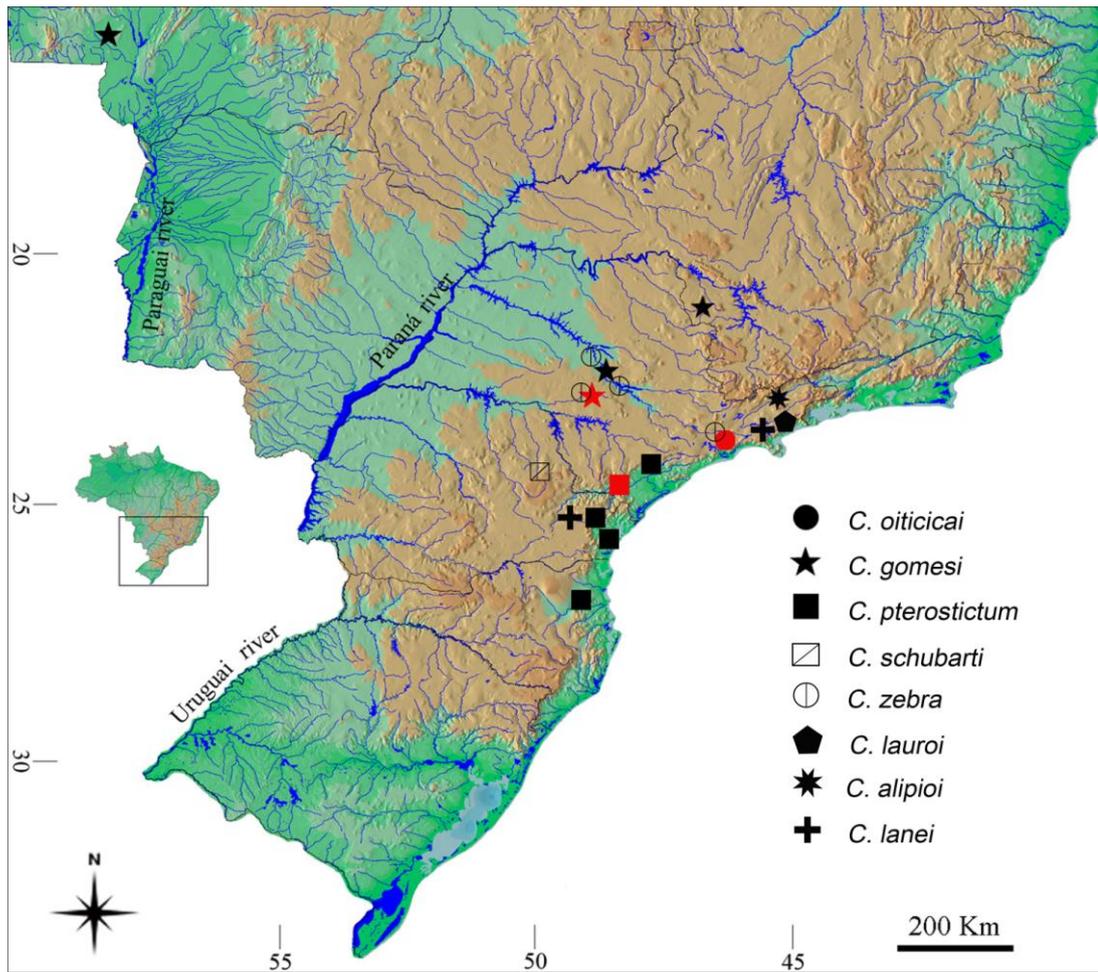


Figura 1 - Mapa indicando as espécies e populações de *Characidium* analisadas no presente estudo. Em vermelho, as populações de *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* que apresentaram cromossomos B.

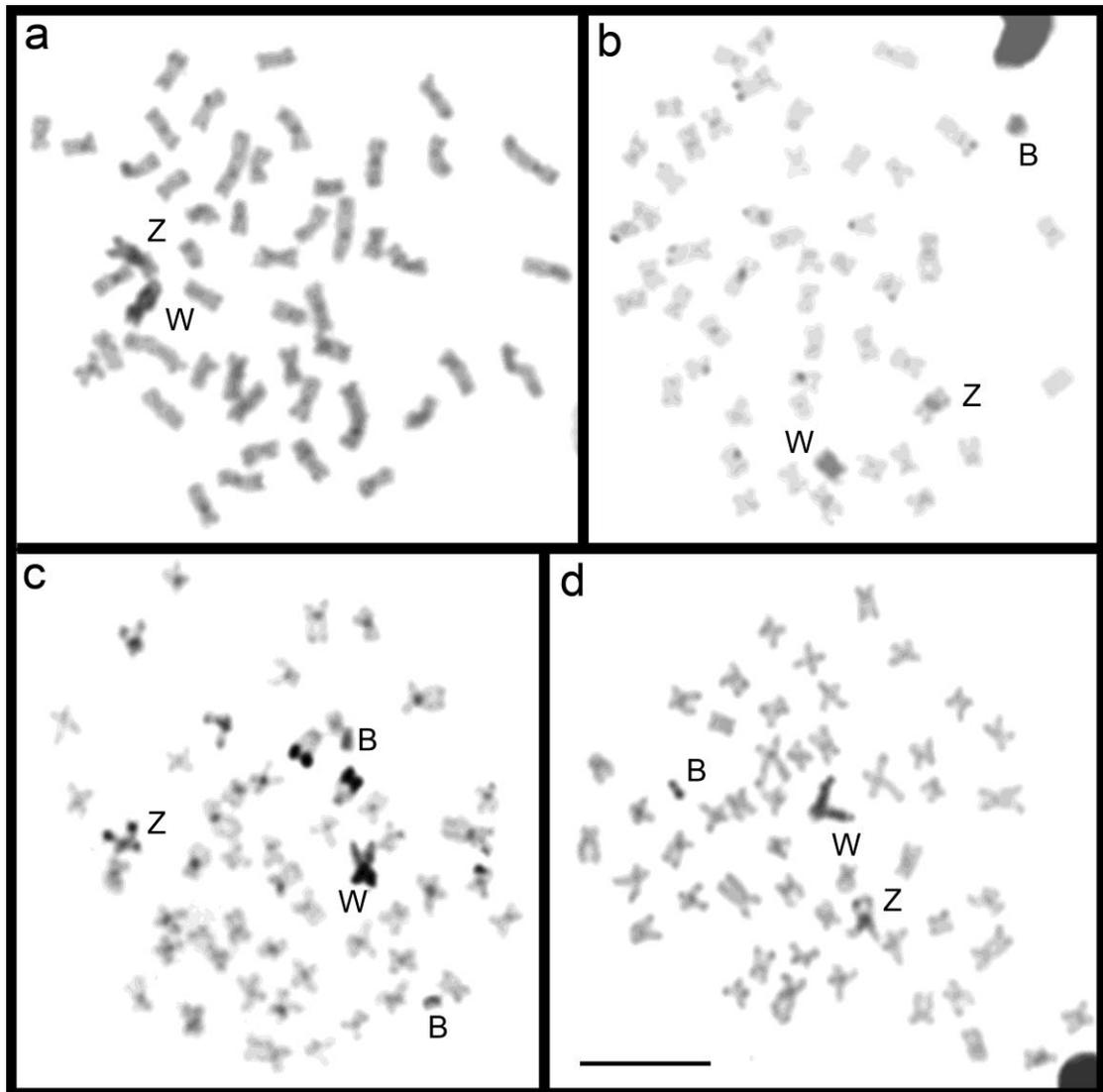


Figura 2 - Metáfases após bandamento C. *C. gomesi* do rio Alambari (a), *C. gomesi* do rio Paranapanema (b), *C. pterostictum* do rio Betari (c) e *C. oiticicai* do rio Paraitinguinha (d). A barra equivale a 10 um.

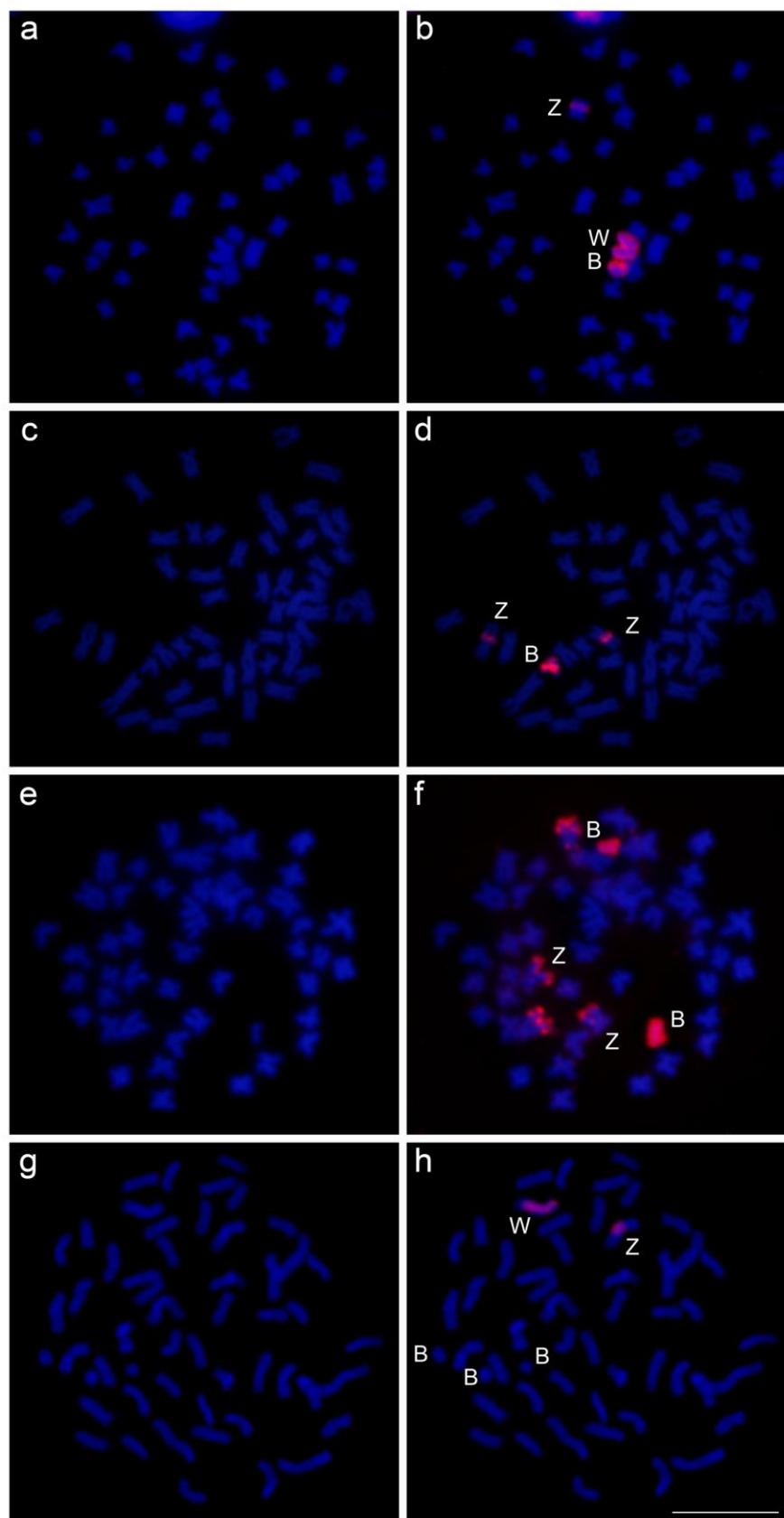


Figura 3 - Pintura cromossômica com a sonda CgB. Metáfases de *C. gomesi* da bacia do rio Paranapanema (1B) fêmea (a e b) e macho (c e d). Em e e f, metáfase de *C. pterostictum* (2B) e em g e h, metáfases de *C. oititicai*.

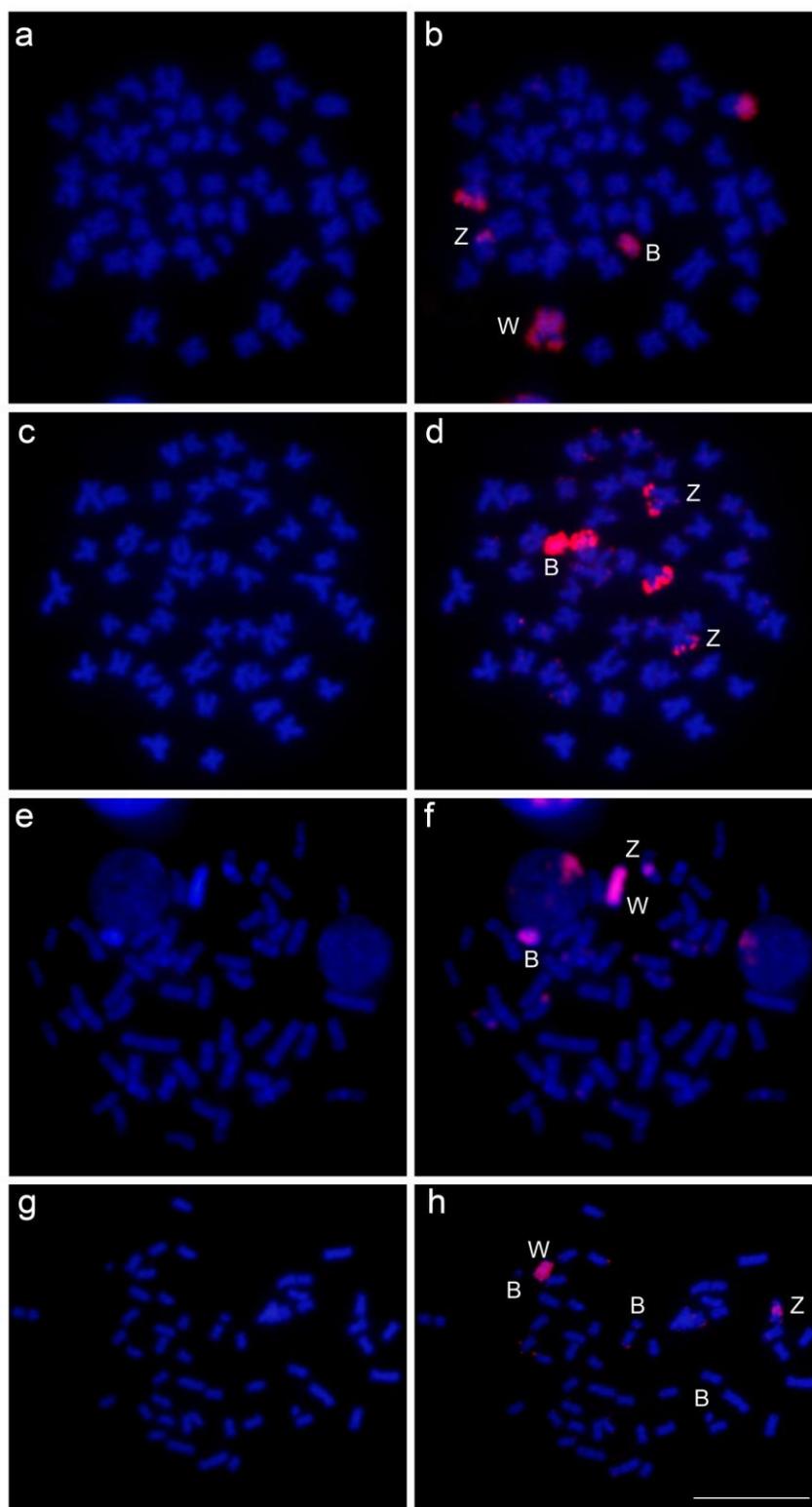


Figura 4 - Pintura cromossômica com a sonda CpB. Metáfases de *C. pterostictum* do rio Betari (1B) fêmea (a e b) e macho (c e d). Em e e f, metáfase de *C. gomesi* (1B) e em g e h, metáfases de *C. oititicaei*.

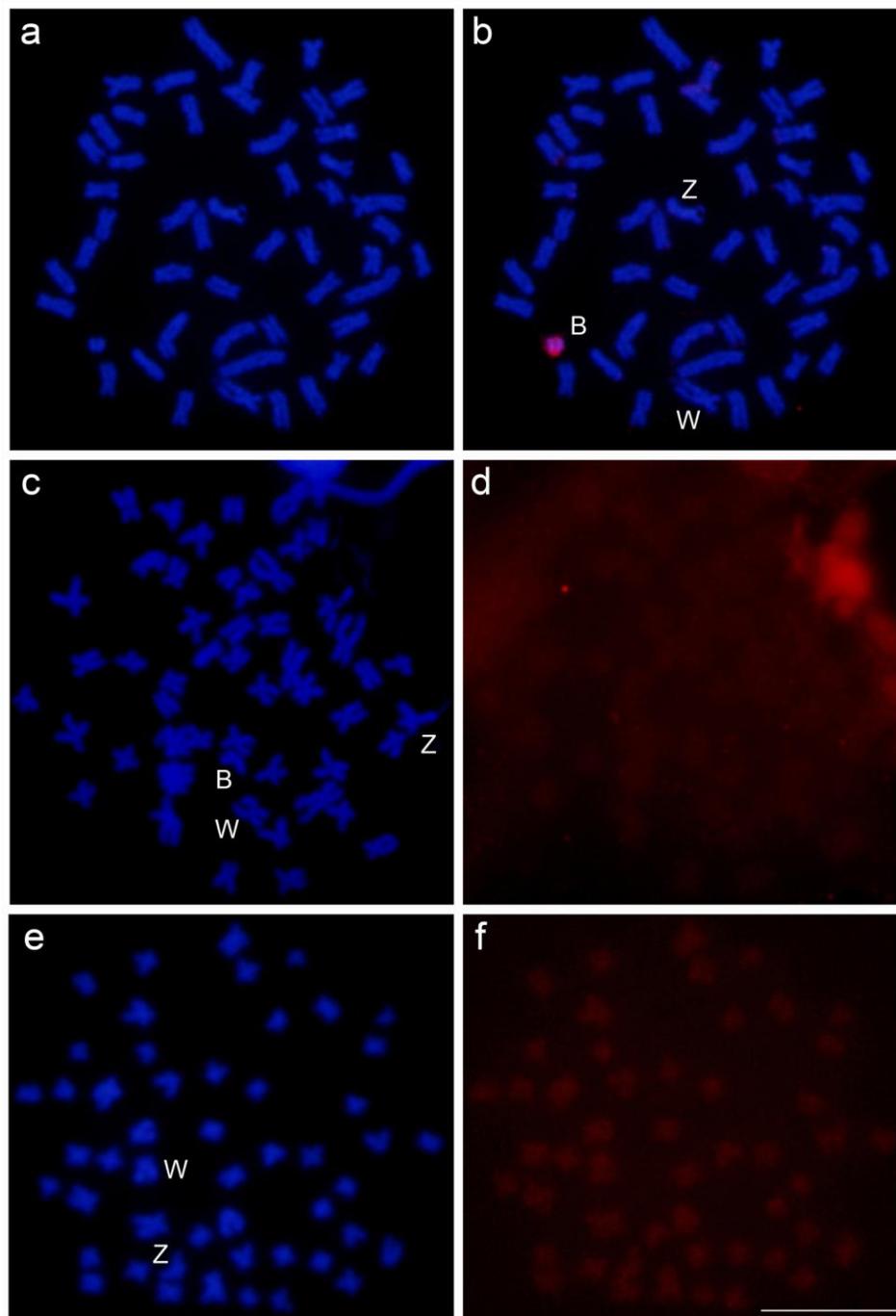


Figura 5 - Pintura cromossômica com a sonda CoB. Metáfases de *C. oiticai* do rio Paraitinguinha (1B) fêmea (a e b). Em c e d, metáfase de *C. gomesi* e em e e f, metáfases de *C. pterostictum*.

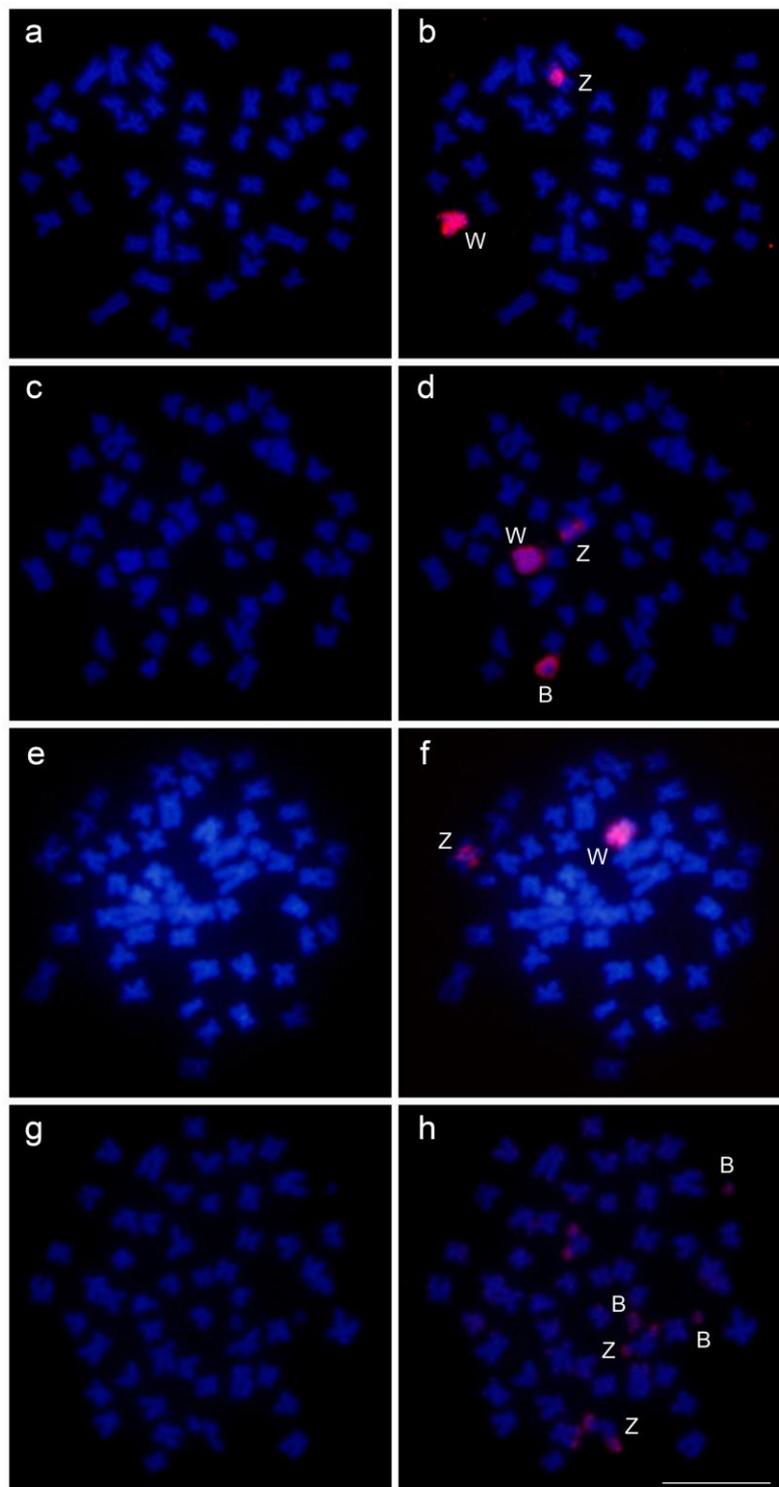


Figura 6 - Pintura cromossômica com a sonda CgW. Metáfases de *C. gomesi* do rio Alambari (a e b) e do rio Paranapanema (c e d). Em e e f, metáfases de *C. oititicaia* e em g e h, metáfases de *C. pterostictum*.

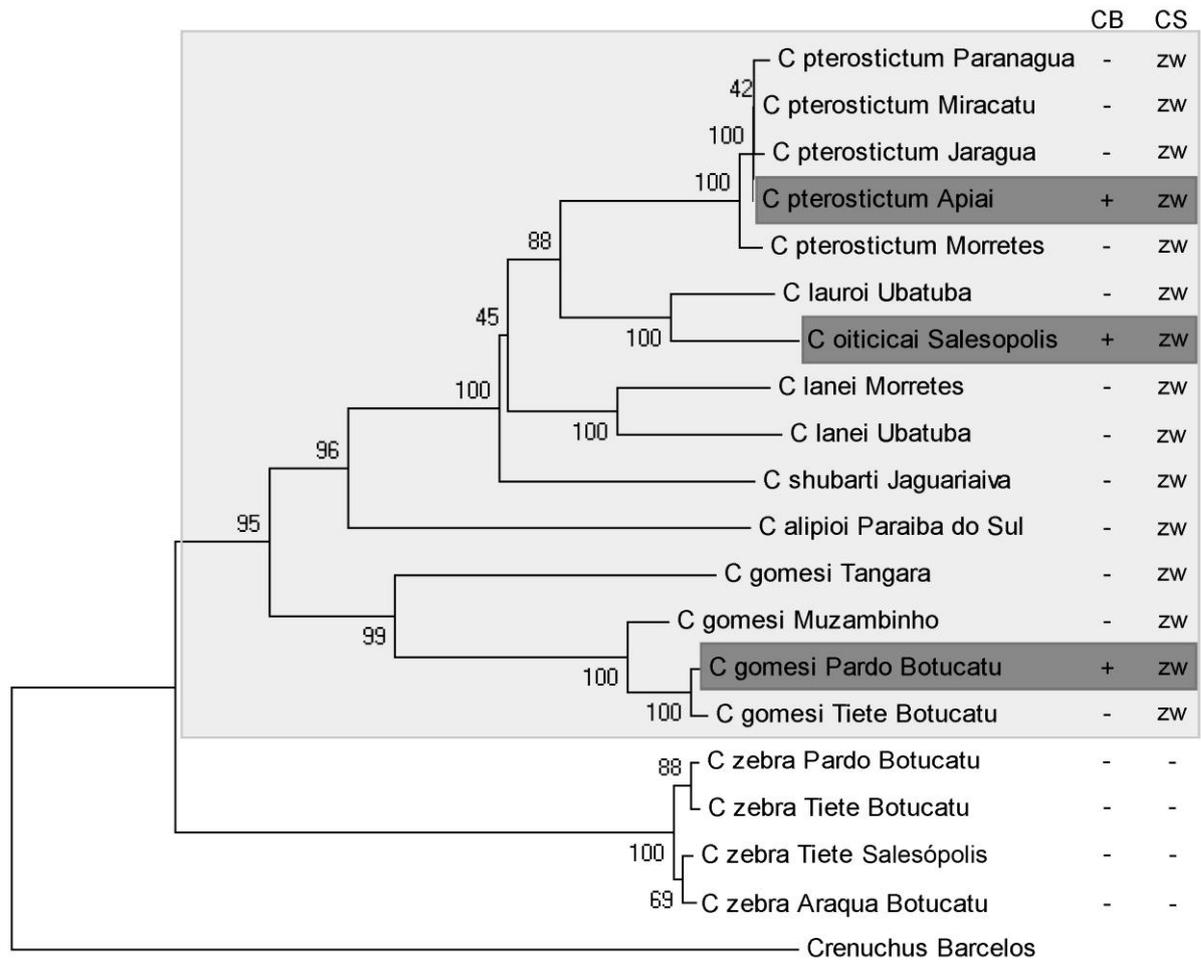


Figura 7 – Árvore construída pelo método de ML, com base em uma matriz de seqüências do gene Citocromo B, testada a partir de 1000 pseudoréplicas de bootstrap. As letras acima dos ramos representam variações de caracteres citogenéticos, conforme: CB: presença ou ausência de cromossomos B, CS: presença ou ausência de cromossomos sexuais.

Capítulo 2

Sequências histônicas e de DNAr 5S em cromossomos B indicam origem independente destes elementos genômicos em espécies do gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae)

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a composição nucleotídica dos cromossomos B presentes em três espécies de *Characidium*, *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, através de técnicas cito-moleculares, que envolveram o mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 5S e 18S e das sequências histônicas H3 e H4. Além disso, foi possível amplificar, clonar, sequenciar e comparar as sequências obtidas de DNAr 5S e DNAhis H3 a partir do DNA genômico de indivíduos 0B e do DNA de cromossomos B isolados por microdissecção. No mapeamento físico, o DNAr 18S foi evidenciado no par número 18 em *C. gomesi* e nos cromossomos sexuais de *C. oiticicai* e *C. pterostictum*. Os sítios para o DNAr 5S foram localizados nos pares 21 e 25 em *C. oiticicai* e *C. gomesi* respectivamente e nos cromossomos 20 e 21 de *C. pterostictum*. Os sítios para o DNA das histonas H3 e H4 foram localizados em sintenia em dois pares autossômicos e nos cromossomos B de *C. pterostictum*, assim como no cromossomo B e em um par autossômico em *C. gomesi*. Em *C. oiticicai*, estas sequências foram localizadas em apenas dois pares autossômicos. Apesar de não serem observados por FISH sítios de DNAr 5S nos cromossomos B destas espécies, foi possível amplificar estas sequências a partir do DNAb microdissecado (μ B-DNA). A análise nucleotídica do DNAr 5S obtidas a partir do μ B-DNA de *C. gomesi* e *C. pterostictum* revelou que tais sequências apresentam homologia com aquelas obtidas do complemento A, apontando para uma ancestralidade comum dessas sequências. Por outro lado, em *C. oiticicai*, o DNAr 5S presente no B se revelou muito divergente do obtido a partir do seu genoma A e das outras espécies, reforçando a hipótese de origem interespecífica. Os dados apresentados além de confirmarem a presença de duas origens para os cromossomos B destas espécies, ainda apresentam esses cromossomos como portadores de numerosas e diversificadas sequências repetitivas de DNA, possivelmente provenientes de vários cromossomos A. Estes

resultados reforçam a eficácia da utilização de DNAs repetitivos como ferramenta na busca pela origem e os caminhos evolutivos percorridos por esses elementos genômicos.

Introdução

Cromossomos B são elementos extras encontrados em muitos genomas eucariotos, em adição aos cromossomos do complemento padrão A. Estes cromossomos não seguem um padrão de regras estabelecidas em relação à distribuição, origem e função, mesmo em organismos intimamente relacionados (Camacho et al, 2000; 2011). De forma geral, o surgimento destes cromossomos pode ocorrer de maneira interespecífica, através de hibridação entre espécies, ou intraespecífica, quando sua origem está relacionada ao complemento A de cromossomos do organismo hospedeiro (Camacho et al, 2000). No entanto, informações precisas sobre a origem destes cromossomos supranumerários são difíceis e complexas, principalmente pela sua natureza não recombinante e pelas propriedades particulares quanto à estrutura e dinâmica, que proporcionam uma rápida evolução molecular (López-Leon et al, 1994).

Estudos citogenéticos e moleculares têm demonstrado que os cromossomos B contêm, de modo geral, numerosas sequências de DNA repetitivo, que incluem famílias multigênicas, DNAs satélites e elementos transponíveis que podem, ou não, estar compartilhadas entre os cromossomos do complemento A (Camacho, 2000). Tais informações já foram documentadas em diferentes grupos de organismos como em plantas (Jamilena et al, 1994; 1995), mamíferos (Stitou et al, 2000; Graphodatsky et al, 2005; Yudkin et al, 2007), insetos (Loreto et al, 2008; Cabral-de-Mello et al, 2010; Teruel et al, 2010; Oliveira et al, 2011) e peixes (Jesus et al, 2003; Baroni et al, 2009; Poletto et al, 2010; Hashimoto et al, 2012) e puderam ser utilizadas na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos de origem dos cromossomos B e, nos casos de origem intra específica, na identificação do cromossomo ancestral cujo cromossomo B foi derivado.

Os peixes pertencentes ao gênero *Characidium* apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada, com $2n=50$ cromossomos em todas as espécies analisadas e um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW que abrange um grande número de espécies e cuja origem parece ter sido comum (Pansonato-Alves et al, 2009; Machado et al, 2011; Capítulo I). Adicionalmente, as espécies *C. pterostictum*, *C. oiticicai* e *C. gomesi* se destacam por apresentarem cromossomos B, que podem ser encontrados na forma de microcromossomos, como ocorre em *C. pterostictum* e *C. oiticicai* ou, como ocorre em *C. gomesi*, estes elementos genômicos podem ser maiores e acrocêntricos (Pansonato-Alves et al, 2010; 2011a, 2011b).

Análises prévias que incluem pintura cromossômica e dados de filogenia molecular neste gênero apontam que os cromossomos B de *C. pterostictum* e *C. gomesi* possuem uma origem semelhante e diretamente relacionada aos processos de diferenciação dos cromossomos sexuais, no entanto, este mesmo evento parece ter ocorrido de forma independente em cada uma das espécies (Capítulo I). Por outro lado, os cromossomos B de *C. oiticicai* não parecem apresentar homologia com os cromossomos B e sexuais das outras espécies, indicando a ocorrência de um evento distinto para o surgimento destes cromossomos (Capítulo 1).

Com o intuito de investigar a composição molecular e aumentar o conhecimento sobre a estrutura dos cromossomos Bs nestas três espécies do gênero *Characidium*, nós realizamos um mapeamento físico de sequências repetitivas (DNAr 5S e 18S, DNAhis H3 e H4) nos cromossomos A e B de *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* utilizando a técnica de FISH, bem como a amplificação por PCR destas sequências a partir de DNA genômico 0B e DNA obtido de cromossomos B microdissecados. Apenas o DNAr 5S se mostrou presente nos cromossomos B das 3 espécies, enquanto o DNAhis H3 também foi encontrado nos cromossomos B de *C. gomesi*. A clonagem e o sequenciamento de parte destas sequências foi

realizada e permitiram a realização de análises comparativas entre as sequências dos cromossomos A e B destas espécies.

Material e métodos

Amostras analisadas

No presente trabalho foram analisadas três espécies do gênero *Characidium*: *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* provenientes de diferentes bacias hidrográficas da região Sul e Sudeste do Brasil (Figura 1, Tabela 1). Após análise, os exemplares foram fixados em formalina 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Preparações

Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína e sacrificados para análise citogenética. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal baseada na técnica referida em Foresti et al. (1981). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan et al. (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Obtenção e marcação das sondas compostas por DNA repetitivo

Para a extração de DNA o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) foi utilizado seguindo a instrução do fabricante. As sequências para DNAr 5S e 18S e DNAhis

H3 e H4 foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico de representantes das três espécies que não apresentaram cromossomos B (0B). Além disso, reações de PCR também foram realizadas utilizando o material genético obtido após a microdissecção e amplificação dos cromossomos B de cada uma das espécies (μ B-DNA) (Capítulo I). As sequências para DNAr 5S e 18S foram amplificadas utilizando, respectivamente, os *primers* 5SA (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') e 5SB (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA-3) (Pendás et al, 1994) e NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') e NS8 (5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3') (White et al, 1990). Para a amplificação dos genes histônicos H3 e H4 os seguintes *primers* foram utilizados, respectivamente, H3F (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3') e H3R (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC-3') (Colgan et al, 1998) e H4F2s (5'-TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C-3') e H4F3er (5'-CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT-3') (Pineau et al, 2005). As reações foram realizadas para um volume final de 25ul, utilizando 200uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 1ul de *Taq* DNA buffer (20mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50mM KCl); 0,5U de *Taq* polimerase (Life Technologies); 0,1uM de cada *primer* e 50ng de DNA genômico.

A marcação das sondas compostas por DNA repetitivo foi realizada através de posteriores reações de PCR utilizando DNA genômico e incluindo o nucleotídeo modificado digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) para marcar o DNAr 5S de *C. gomesi*, DNAr 18S em *C. oiticicai* e *C. pterostictum* e DNAhis H3 e biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) para marcar o DNAr 5S em *C. oiticicai* e *C. pterostictum*, DNAr 18S em *C. gomesi* e DNAhis H4.

Hibridação in situ Fluorescente

Para os experimentos de FISH os cromossomos foram tratados de acordo com procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986), utilizando uma estringência de 77%. As sondas marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) tiveram seus sinais detectados utilizando avidina-FITC (Roche Applied Science) e as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) tiveram seus sinais detectados com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos metafásicos foram contracorados com DAPI e as imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital (Olympus DP70) acoplada a um fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX61). A montagem dos cariótipos e a padronização de brilho e contraste foram feitos no programa Adobe Photoshop CS4.

Análises moleculares

Os produtos de PCR obtidos a partir do μ B-DNA foram isolados do gel e purificadas usando o GE – PCR DNA e Gel Band Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, estes fragmentos de DNA foram clonados com o Kit TOPO TA (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a obtenção das sequências, os produtos de PCR oriundos dos clones e de DNA genômico foram purificados usando ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo as instruções do fabricante e usados para montar reações de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), submetido ao programa presente no manual do kit. Os produtos destas reações foram purificados e as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. As

sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência consenso. As sequências contigs foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) disponível online no link <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html> e submetidas ao programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) no dia 05/10/2012 para a busca de similaridades de sequências disponíveis neste banco de dados. As análises de divergência genética foram realizadas com o software MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007) utilizando o método de Neighbor-Joining e modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

Resultados

Análises citogenéticas

Os estudos cariotípicos evidenciaram que as três espécies de *Characidium* analisadas apresentam cromossomos B (Capítulo 1), ocorrendo em 84% dos exemplares de *C. gomesi*, 33% de *C. pterostictum* e 70% de *C. oiticicai* (Tabela 2). Nestas espécies, estes cromossomos se apresentam em tamanho pequeno e acrocêntricos, no entanto, em *C. gomesi*, os cromossomos B são de tamanho ligeiramente maior. Em *C. gomesi* e *C. oiticicai* uma variação de zero a quatro cromossomos B foi identificada, enquanto em *C. pterostictum* esses valores variam entre zero e dois cromossomos (Tabela 2).

FISH com sondas de DNAr 5S e 18S e DNAr H3 e H4

As hibridações utilizando as sondas de DNAr 18S revelaram marcações em posição terminal no braço longo do par 18 em *C. gomesi*, enquanto em *C. oiticicai* e *C. pterostictum* esses sítios foram localizados em posição próxima ao telômero dos braços curtos do

cromossomo Z e dos braços longos do cromossomo W. A FISH com sondas de DNAr 5S evidenciou marcações diferenciais para cada espécie, estando na região intersticial do par 21 em *C. oiticicai* e do par 25 de *C. gomesi*, enquanto em *C. pterostictum* as marcações ocuparam a região pericentromérica dos pares 20 e 21. Nenhuma das sondas ribossômicas evidenciou qualquer sinal de hibridação nos cromossomos Bs (Figura 1).

O mapeamento de sítios histônicos H3 e H4 nas espécies de *Characidium* revela que ambos se co-localizam no genoma das espécies, sendo encontrados na região pericentromérica do par metacêntrico 5 e em região subterminal do par metacêntrico 10 em *C. oiticicai* e *C. pterostictum*. Em *C. gomesi* essas sequências foram encontradas em posição subterminal do cromossomo metacêntrico 10. Além disso, sinais nítidos de hibridação foram detectados nos cromossomos Bs de *C. pterostictum* e *C. gomesi* (Figura 1).

Análises moleculares

Dentre as reações realizadas utilizando como molde o μ B-DNA, apenas aquelas utilizando os *primers* para DNAr 5S foram efetivas nas três espécies. Foi evidenciada a presença de dois fragmentos no DNA genômico das três espécies, sendo um menor composto por cerca de 400 pares de bases e outro maior com aproximadamente 700 pares de bases (Figura 2a). Em *C. oiticicai* as amplificações do DNAr 5S realizadas a partir do μ B-DNA também evidenciaram dois fragmentos genômicos, sendo um menor composto por cerca de 300 pares de bases e o maior com aproximadamente 500 pares de bases (Figura 2b); já em *C. pterostictum* e *C. gomesi* apenas um fragmento foi obtido a partir do μ B-DNA sendo composto por cerca de 300 pares de bases (Figura 2b). Além disso, os *primers* para amplificação do DNAr H3 também obtiveram sucesso utilizando o μ B-DNA de *C. gomesi* resultando em um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases (Figura 3). Todos estes

produtos foram clonados e sequenciados, apresentando homologia com sequências de DNAr 5S e DNAr H3 depositadas no GenBank.

O procedimento de clonagem do fragmento de DNAr 5S gerou 57 clones que foram utilizados na análise em conjunto com alguns dados genômicos de espécies deste gênero. A matriz de dados resultante do sequenciamento do DNAr 5S foi composta por 501bp. As distâncias genéticas entre uma mesma sequência e entre diferentes sequências foram calculadas e se encontram sumarizadas nas tabelas 3 e 4. Uma árvore de distância baseada nesta matriz também foi gerada e está representada na Figura 4.

O procedimento de clonagem do fragmento de DNAr H3 de *C. gomesi* gerou 21 clones que foram utilizados na análise em conjunto com alguns dados genômicos de espécies deste gênero. A matriz de dados resultante deste sequenciamento foi composta por 380bp. As distâncias genéticas entre um mesmo conjunto de sequências e entre diferentes conjuntos foram calculadas e se encontram sumarizadas nas tabelas 5 e 6. Uma árvore de distância baseada nesta matriz também foi gerada e está representada na Figura 5.

Discussão

Os representantes do gênero *Characidium* apresentam consideráveis divergências cromossômicas microestruturais dos seus representantes nos níveis intra e interespecíficos, embora as características cariotípicas macroestruturais se mostrem bastante conservadas, em sua maioria exibindo cariótipos com 50 cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Em algumas espécies deste gênero é constatada a presença de cromossomos B e de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, além de uma distribuição bastante variável de sequências repetitivas de DNA (Vicari et al, 2008; Pansonato-Alves et al, 2011a, 2011b). Os dados obtidos no presente estudo corroboram estas proposições e evidenciam que os sítios

ribossômicos 5S e 18S estão dispersos diferencialmente pelos genomas das diferentes espécies e participam efetivamente da diferenciação cariotípica destas amostras e da evolução dos cromossomos sexuais (Pansonato-Alves et al, 2011; Machado et al, 2011).

Embora estudos direcionados ao mapeamento físico de sequências histônicas em peixes sejam reduzidos (Pendás et al, 1994; Hashimoto et al, 2011, Lima-Filho et al, 2012), estes marcadores apresentam características interessantes com relação a uma condição cromossômica conservada em espécies próximas e associação com DNAr 5S (Hashimoto et al, 2011, Lima-Filho et al, 2012). Aqui, nós mostramos que, em *Characidium*, os sítios histônicos H3 e H4 não se distribuem de forma tão conservada quanto se supunha e revela a necessidade do mapeamento de mais espécies para avançar no conhecimento sobre a distribuição e organização destas sequências. Além disso, o mapeamento de genes histônicos nos cromossomos B de *C. gomesi* e *C. pterostictum* constitui o primeiro relato de localização deste tipo de sequência em cromossomos supranumerários de peixes e pode fornecer respostas importantes com relação à origem e evolução destes elementos no gênero *Characidium*.

Em gafanhotos da espécie *Locusta migratoria*, experimentos de pintura cromossômica utilizando sondas a partir dos cromossomos X e B sugerem que os cromossomos B desta espécie surgiram de forma intraespecífica (Teruel et al, 2009b). Posteriormente, a ocorrência de genes histônicos em cromossomos B desta espécie foi demonstrada (Teruel et al, 2009a) e, a constatação de que os sítios de DNAr H3 e H4 são extensamente conservados em diversas espécies próximas (Cabrero et al, 2009), levou a formulação da proposta de que este elemento supranumerário teria se originado a partir de um cromossomo portador de sítios histônicos, no caso, o par 8 (Teruel et al, 2009a). Em *Characidium*, os resultados provenientes de mapeamento de DNA repetitivo representam um impasse em relação à ideia da origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais, principalmente se levarmos em conta que, em *C. pterostictum* e *C. gomesi*, o DNAr H3 e H4 está presente no cromossomo B e ausente

no sexual, enquanto o inverso ocorre com o DNAr 18S (Pansonato-Alves et al, 2010; Capítulo 1, Figuras 1).

Tendo alguns organismos como modelo, têm se sugerido a ideia de que o fato das regiões das RONS serem sensíveis a quebras cromossômicas propiciaria a existência de um mecanismo pelo qual os cromossomos B poderiam ser gerados. No entanto, um cromossomo B que se origina de um fragmento autossômico contendo uma região de RON pode também perder estas sequências ribossômicas através de recombinação intracromossômica (Camacho et al, 2000), o que justificaria a ausência destes sítios nos cromossomos supranumerários de *C. pterostictum* e *C. gomesi*. Adicionalmente, a presença de sítios histônicos nestes cromossomos B e ausentes nos sexuais poderia ser explicada pela ocorrência de genes orphon-like (Childs et al, 1981) nos cromossomos sexuais e posterior amplificação após a diferenciação dos supranumerários ou, até mesmo, transposição destes sítios. No entanto, a ocorrência de sítios histônicos em dois cromossomos B cujos eventos de origem parecem ser independentes e relacionados aos cromossomos sexuais, exigiria uma hipótese de eventos também independentes, que culminam no aparecimento dos genes histônicos nestes cromossomos, fato que ainda deixa em aberto a questão do cromossomo que deu origem a estes supranumerários.

Além de uma abordagem física, que inclui mapeamento e pintura cromossômica, os estudos citogenéticos focados em origem e evolução de cromossomos B podem utilizar a ferramenta da microdissecção para isolar o conteúdo genético presente nos cromossomos B e utilizá-lo em reações de PCR, permitindo comparar sequências que estão alocadas no genoma padrão e nos supranumerários. Em estudo pioneiro, Teruel et al. (2009) verificaram, por meio de similaridades, a origem intra específica do cromossomo B e as funções de sequências histônicas presentes nestes elementos em uma espécie de gafanhoto. Em *Characidium*, apesar de não serem localizadas por FISH (Figura 1), as sequências do gene ribossômico 5S estavam

presentes nos cromossomos B das três espécies analisadas (Figura 2b), o que, provavelmente, está relacionado à presença destes sítios em número abaixo do limite de sensibilidade da FISH. Em contrapartida, apesar de encontrarmos histonas H3 e H4 nos cromossomos B de *C. gomesi* e *C. pterostictum* (Figura 1), essas sequências foram amplificadas apenas a partir do μ B-DNA de *C. gomesi* (Figura 3). Além disso, foi possível amplificar as histonas H3 e H4 a partir o μ B-DNA de *C. pterostictum*, assim como o DNAr 18S a partir do μ B-DNA de *C. gomesi*, contudo, esses resultados não foram reprodutíveis, impossibilitando a confiabilidade nos dados e o avanço dos procedimentos.

Embora não fique claro de quais cromossomos os elementos supranumerários se derivaram, verificou-se com os dados de sequenciamento que em *C. pterostictum* e *C. gomesi*, as sequências de DNAr 5S amplificadas a partir do μ B-DNA, assim como as sequências de DNAs H3 obtidas do μ B-DNA de *C. gomesi* apresentam um grau maior de similaridade em nível intra específico, o que permite concluir que estes cromossomos B podem ter se originado de forma intraespecífica e por eventos independentes, corroborando análises prévias realizadas (Capítulo I). Por outro lado, em *C. oiticicai* as sequências obtidas do μ B-DNA se mostraram bastante divergentes, tanto em relação aos outros tipos de cromossomos B, quanto ao genoma das três espécies analisadas, indicando o não compartilhamento de sequências entre o cromossomo B e o genoma hospedeiro. Os resultados de pintura cromossômica também revelam esta característica (Capítulo I) e, neste caso, poderíamos hipotetizar que os cromossomos B de *C. oiticicai* surgiram de forma independente e interespecífica.

Segundo McAllister e Werren (1997), a melhor explicação para a transferência de um fragmento cromossômico a partir de uma espécie de vespa do gênero *Trichomalopsis* para *N. vitripennis* seria através da cópula e fertilização, o que requer dois fatores, como (i) a associação ecológica das duas espécies e (ii) a quebra dos mecanismos de isolamento pré-zigóticos entre elas. Deve ser destacado que *C. oiticicai*, coletado no rio Paraitinga, vive em

simpatria com a espécie *C. zebra* e, nesse sentido, é considerado o fato das duas espécies dividirem o mesmo espaço físico poderia ter ocasionado cruzamentos interespecíficos. Assim, considera-se que a análise de sequências genômicas de *C. zebra* seria de fundamental importância para testar tal hipótese de origem.

Finalmente, os dados de mapeamento físico de sequências repetitivas em espécies portadoras de cromossomos B do gênero *Characidium* permitiram vislumbrar novos questionamentos sobre a origem destes elementos genômicos, deixando de considerar os cromossomos sexuais como os únicos candidatos a esse papel. Além disso, o sequenciamento do DNAr 5S e histona H3 proveniente do gDNA e μ B-DNA corrobora a proposição de origem independente destes cromossomos nas três espécies e reforça que, em *C. oiticicai*, provavelmente o cromossomo B se originou de forma interespecífica.

Referências

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

Tabela 1 - Exemplares de *Characidium* analisados neste estudo: LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. F: fêmeas; M: machos.

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>C. gomesi</i>	16908	Cachoeira Véu Noiva – Botucatu -SP	19	4	S 22°59'25" W 48°25'40"
<i>C. oiticicai</i>	16910	Rio Paraitinguinha – Salesópolis - SP	6	4	S 23°30'40" W 45°51'32"
<i>C. pterostictum</i>	16909	Rio Betari – Apiaí - SP	11	7	S 24°33'73" W 48°40'16"

Tabela 2 - Polimorfismos de cromossomos B em populações de *Characidium*. Prevalência: Porcentagem de exemplares portando cromossomos B.

Espécie/População	Exemplares	Número de exemplares com até:					Prevalência
		0B	1B	2B	3B	4B	
<i>C. gomesi</i> / Cachoeira Véu de Noiva	25	4	7	9	4	1	84,00%
<i>C. pterostictum</i> /rio Betari	18	12	5	1			33,33%
<i>C. oiticicai</i> /rio Paraitinga	10	3	5	1		1	70,00%

Tabela 3 - Distância média entre os grupos de sequências de DNAr 5S obtidas de gDNA e μ B-DNA, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

Distância média entre os grupos de sequências									
<i>5sB_bandamaior_C. oiticicai</i>									
<i>5sB_C. gomesi</i>	0,46								
<i>5sB_C. pterostictum</i>	0,454	0,185							
<i>5sB_bandamenor_C. oiticicai</i>	0,102	0,488	0,451						
<i>5sGen_bandamenor_C. gomesi</i>	0,444	0,018	0,167	0,472					
<i>5sGen_bandamaior_C. gomesi</i>	0,458	0,025	0,176	0,486	0,007				
<i>5sGen_bandamenor_C. oiticicai</i>	0,435	0,168	0,067	0,425	0,15	0,159			
<i>5sGen_bandamaior_C. oiticicai</i>	0,449	0,18	0,078	0,438	0,162	0,165	0,014		
<i>5sGen_bandamaior_C. pterostictum</i>	0,505	0,186	0,075	0,499	0,172	0,177	0,026	0,034	
<i>5sGen_bandamenor_C. pterostictum</i>	0,446	0,168	0,07	0,436	0,15	0,159	0,014	0,023	0,028

Tabela 4 - Distância média dentro dos grupos de sequências de DNAr 5S obtidas de gDNA e μ B-DNA, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

Distância média dentro do grupo das sequências	
<i>5sB_bandamaior_C. oiticicai</i>	0,03391735
<i>5sB_C. gomesi</i>	0,03306525
<i>5sB_C. pterostictum</i>	0,10380584
<i>5sB_bandamenor_C. oiticicai</i>	0,02091414
<i>5sGen_bandamenor_C. gomesi</i>	0
<i>5sGen_bandamaior_C. gomesi</i>	0
<i>5sGen_bandamenor_C. oiticicai</i>	0
<i>5sGen_bandamaior_C. oiticicai</i>	0,02301844
<i>5sGen_bandamaior_C. pterostictum</i>	0,03348368
<i>5sGen_bandamenor_C. pterostictum</i>	0

Tabela 5 - Distância média entre os grupos das sequências de DNAhis H3 obtidas de gDNA e μ B-DNA, computadas pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

Distância média entre os grupos de sequências					
H3Gen_ <i>C. gomesi</i>					
H3Gen_ <i>C. oiticicai</i>	0,015				
H3Gen_ <i>C. pterostictum</i>	0,018	0,016			
H3Gen_ <i>C. zebra</i>	0,018	0,023	0,02		
H3B_ <i>C. gomesi</i>	0,012	0,023	0,025	0,025	
H3Gen_ <i>Synbranchus</i>	0,129	0,137	0,132	0,13	0,137

Tabela 6 - Distância média dentro dos grupos das sequências de DNAhis H3 obtidas de gDNA e μ B-DNA, computadas pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

Distância média dentro do grupo das sequências	
H3Gen_ <i>C. gomesi</i>	0,0053
H3Gen_ <i>C. oiticicai</i>	0,008
H3Gen_ <i>C. pterostictum</i>	0,0107
H3Gen_ <i>C. zebra</i>	0,0107
H3B_ <i>C. gomesi</i>	0,0075

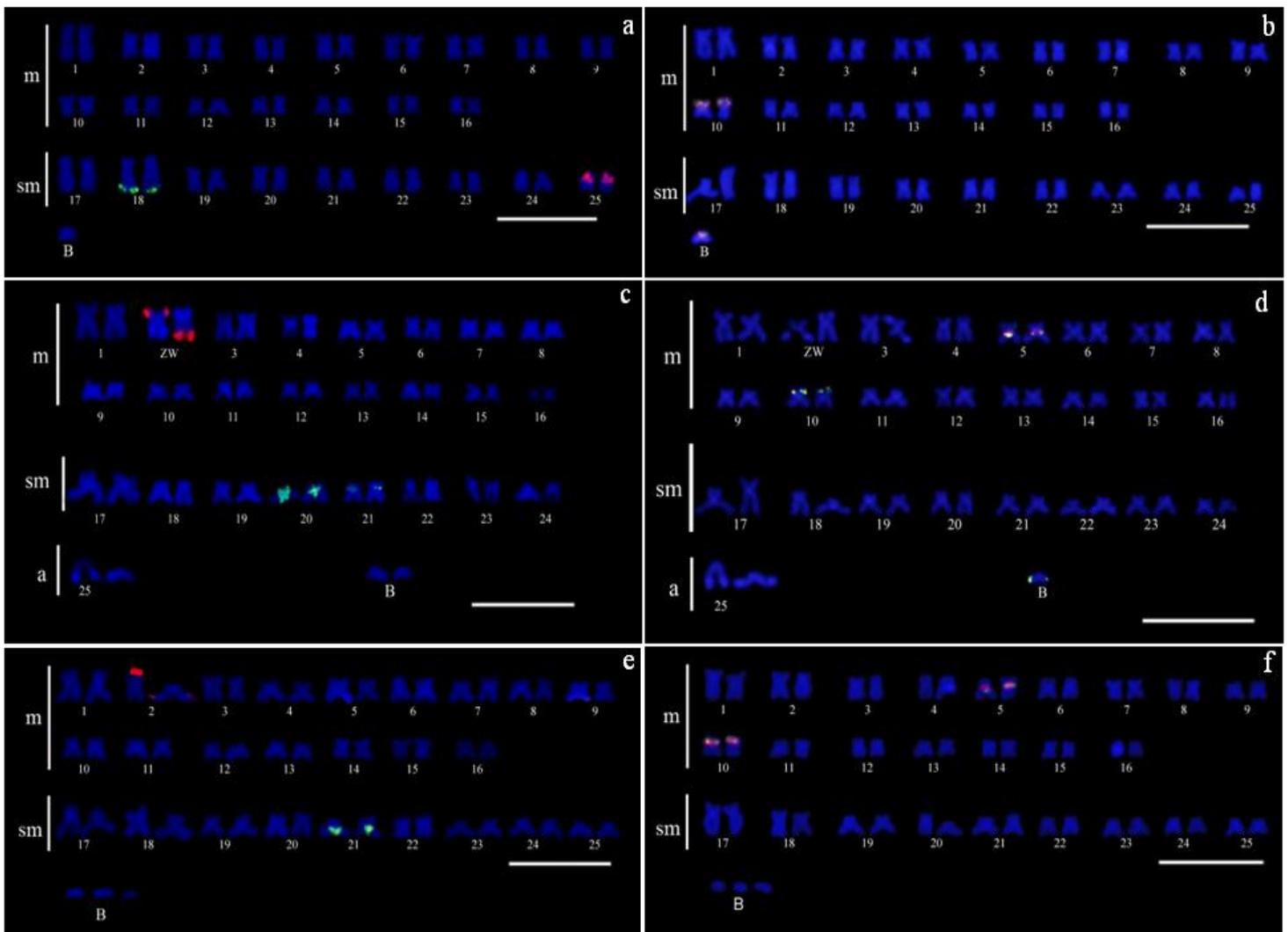


Figura 1 - Cariótipos de exemplares das espécies de *Characidium* mostrando os sítios de DNAr 18S e 5S (a, c e e) e DNAhis H3 e H4 (b, d e f). Em a e b cariótipos de *C. gomesi* , em c e d cariótipos de *C. pterostictum*, em e e f cariótipos de *C. oiticicai*. Notar que não são observados sítios de DNAr nos cromossomos B, enquanto em *C. gomesi* e *C. pterostictum* são observados sítios de DNAhis nos cromossomos B. A barra equivale a 10 μ m.

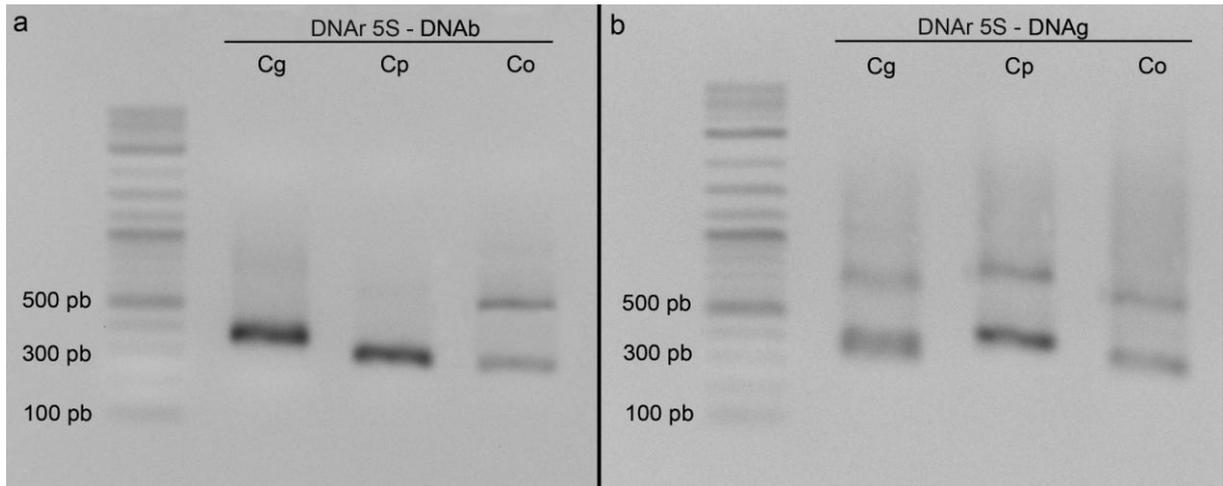


Figura 2 - Gel de agarose evidenciando os diferentes padrões de amplificação das sequências de DNAr 5S. Em a, ampliações a partir do DNA dos cromossomos B microdissecados e em b, ampliações a partir do DNA genômico de indivíduos sem cromossomos B. Cg – *C. gomesi*, Cp – *C. pterostictum* e Co – *C. oiticicai*.

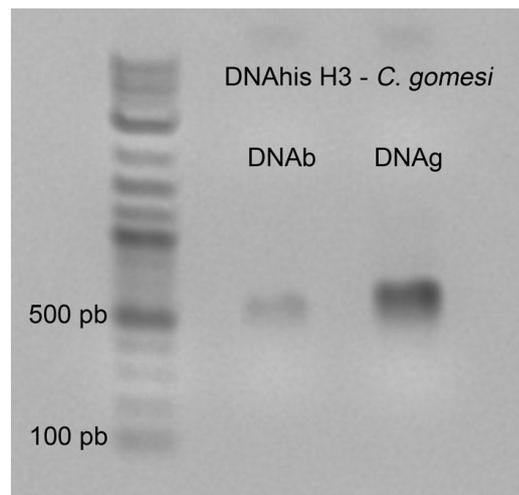


Figura 3 - Gel de agarose evidenciando o padrão de amplificação das sequências de DNAhis H3 a partir do DNA dos cromossomos B microdissecados e do DNA genômico em *C. gomesi*.

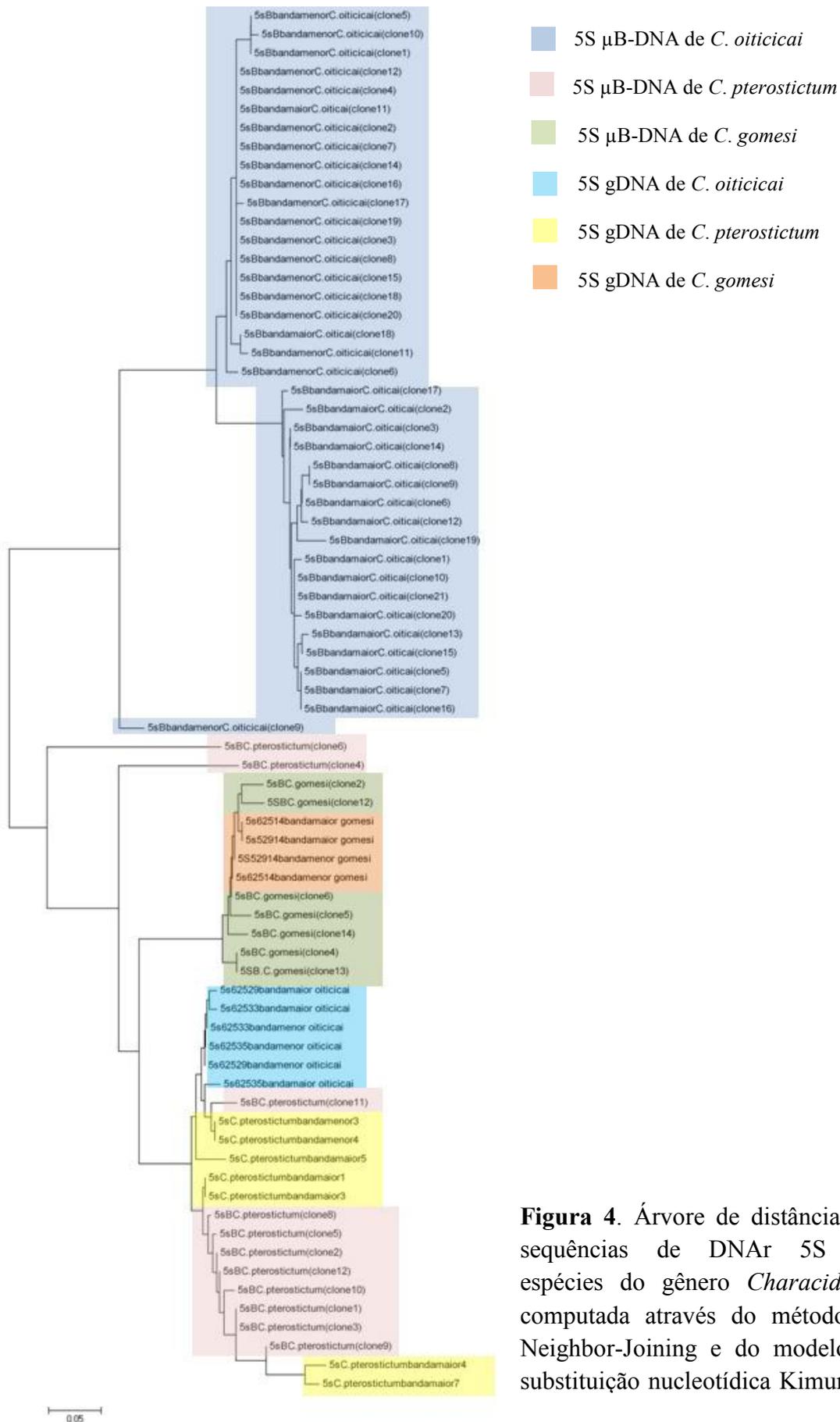


Figura 4. Árvore de distância das sequências de DNAr 5S em espécies do gênero *Characidium*, computada através do método de Neighbor-Joining e do modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-

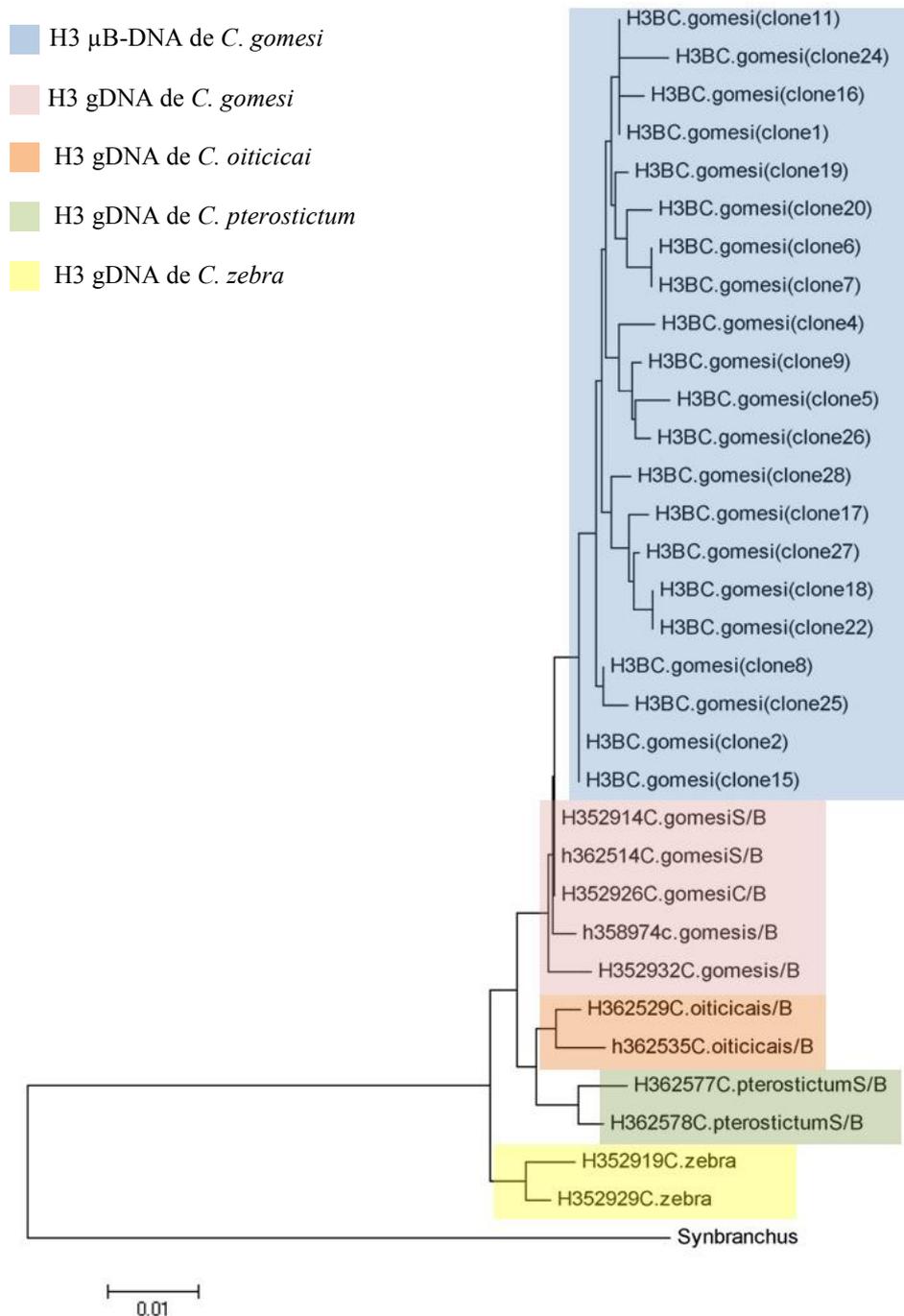


Figura 5. Árvore de distância das sequências de DNAs H3 em espécies do gênero *Characidium*, computada através do método de Neighbor-Joining e do modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P).

5 Considerações finais

Muitos trabalhos realizados envolvendo cromossomos B têm confirmado que eles são em grande parte compostos de sequências de DNA repetitivo, entre os quais DNA ribossomal, DNA centromérico e telomérico, além de elementos móveis. Os cromossomos B podem surgir de maneira intra específica, quando sua origem está relacionada ao genoma A do organismo hospedeiro (cromossomos A), ou de forma interespecífica, através de hibridação entre espécies. Nos últimos anos muitos estudos tem buscado atribuir uma função, investigar a estrutura, origem e transmissão desses elementos, mas o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular e estrutural destes elementos ainda pode ser considerado bastante restrito.

Neste trabalho a realização de estudos envolvendo microdissecção cromossômica, hibridação *in situ* e amplificação de genes ribossomais e histônicos forneceram informações sobre a estrutura molecular e possíveis origens para os cromossomos B e sexuais em espécies do gênero *Characidium*, se caracterizando como ferramentas significativas em trabalhos com essa finalidade. Os resultados obtidos pela pintura cromossômica com as sondas produzidas a partir dos cromossomos B microdissecados de *C. gomesi* e *C. pterostictum*, apontaram para uma origem intra específica e única, mais especificamente a partir dos cromossomos sexuais, porém independentes, considerando o posicionamento dessas espécies em diferentes clados. Por outro lado, a falta de homologia apresentada pela sonda do cromossomo B de *C. oiticiai* com seu próprio genoma A, como também ao genoma A e B das outras espécies, aponta uma origem independente e possivelmente interespecífica para este cromossomo. A hibridação com as sondas CgW, GgB e CpB e a reconstrução

filogenética de algumas espécies de *Characidium*, nos permite indicar uma condição monofilética para este grupo e uma origem única para os cromossomos sexuais.

Os resultados provenientes de mapeamento de DNA repetitivo forneceram o primeiro relato de genes para histonas em cromossomos B de peixes, porém surgem como um impasse em relação à ideia de surgimento do cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais, já que em *C. pterostictum* e *C. gomesi* o DNAhis H3 e H4 está presente no cromossomo B e ausente no sexual, enquanto o inverso ocorre com o DNAr 18S. Isso poderia ser explicado pela ocorrência de genes orphon-like nos cromossomos sexuais e posterior amplificação após a diferenciação dos supranumerários ou, até mesmo, transposição destes sítios localizadas nos cromossomos B de *C. pterostictum* e *C. gomesi*, que provavelmente ocorreram de forma independente nestas espécies, fato que ainda deixa em aberto a questão do cromossomo que deu origem a estes supranumerários. Já a ausência do DNAr 18S nos cromossomos B poderia ser decorrente de eventos de recombinação intracromossômica acarretando a perda destas sequências.

Com os dados de sequenciamento nós podemos verificar que, em *C. pterostictum* e *C. gomesi*, as sequências de DNAr 5S amplificadas a partir do gDNA e μ B-DNA, assim como as sequências de DNAhis H3 obtidas do gDNA e μ B-DNA de *C. gomesi*, apresentam um grau maior de similaridade em nível intraespecífico. Por outro lado, em *C. oiticicai*, as sequências obtidas do μ B-DNA se mostraram bastante divergentes, indicando o não compartilhamento de sequências entre o cromossomo B e o genoma hospedeiro. Esses resultados corroboram aqueles obtidos pela pintura cromossômica, e nos reafirmam a hipótese de origem intraespecífica e independente desses elementos em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, e interespecífica em *C. oiticicai*.

Considera-se que os dados apresentados aqui fornecem fortes evidências da presença de uma origem única para os cromossomos sexuais e de distintas origens para os cromossomos B destas espécies, porém não consideram os cromossomos sexuais como os únicos candidatos a cromossomos ancestrais e, ainda, apresentam esses cromossomos supranumerários como quebra-cabeças de sequências repetitivas que podem ser provenientes de outros cromossomos A.

6 Referências

- Adam, R. D. Chromosome-size variation in *Giardia lamblia*: the role of rDNA repeats. *Nucl. Acids Res.* 1992; 20: 3057-306.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 1990; 215: 403–410.
- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica.* 2006; 127: 243-252.
- Artoni RF, Bertollo LAC. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. *Heredity.* 2002; 89: 15-19.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica.* 2006; 127: 277-284.
- Bertollo LAC, Takahash CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet.* 1978; 1: 103-120.
- Brinkman JN, Sessions SK, Houben A, Green DM. Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Chromosome Res.* 2000; 8: 477-485.
- Buckup PA, Reis RE. Characidiin genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in southern Brazil, with description of three new species. *Copeia.* 1997; 3: 531-548.
- Buckup PA. Family Crenuchidae (South American Darters). In: Reis R, Kullander ESO, Ferraris Jr CJ editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs. 2003; p 87-95.

- Bugrov AG, Karamysheva TV, Pyatkova MS *et al.* B chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir (Orthoptera, Acrididae) analyzed by chromosome microdissection and FISH. *Folia Biol Krakow.* 2003; 51: 1-11.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN, Warchalowska-Sliwa E, Tatsuta H, Runtsov NB. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research.* 2007; 15:315-326.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C: Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity.* 2010; 104:393-400.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, LópezLeón MD. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma.* 2003; 112: 207–211.
- Cabrero J, López-Léon MD, Teruel M, Camacho JPM. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res.* 2009, 17:397–404.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW. B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2000; 355:163-178.
- Camacho JPM. B chromosomes. In: Gregory TR editor. *The evolution of the genome.* Elsevier, San Diego. 2005; p 223-286.
- Campo D, Machado-Schiaffino G, Horreo JL, Garcia-Vazquez E. *Journal of Molecular Evolution.* 2009, 68: 208-216.
- Camacho JP, Schmid M, Cabrero J. B chromosomes and sex in animals. *Sex Dev.* 2011, 5:155–166.

- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*. 2008, 72:1907–1932.
- Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. *Chrom. Res*. 2000, 8:627-634.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes): Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*. 2001, 5:253-260.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*. 2003, 138:213-218.
- Cheng YM, Lin BY. Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*. 2003; 164: 299-310.
- Childs G, Maxson R, Cohn RH, Kedes L (1981) Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. *Cell* 23:651–663.
- Cole CJ, Levans CR. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev.* 1971; 3: p 102.
- Colgan D, McLauchlan A, Wilson G, Livingston S. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust J Zool*. 1998, 46:419–43.
- Dawley, R. M. An introduction to unisexual vertebrates. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (ed. R. M. Dawley & J. P. Bogart). New York: University of the State of New York. 1989.
- Dhar M, Friebe B, Koul AK, Gill BS. Origin of an apparent B chromosome by mutation chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma*. 2002; 111:332-340.

- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 2008; 122: 163-168.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 2004; 32: 1792-1797.
- Eirín-López JM, Ruiz MF, González-Tizón AM, Martínez A, Sánchez L, Méndez J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: First record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphan” features. *J Mol Evol.* 2004, 58:131–144.
- Erdtmann, B., Clacagnoto, D., Rabolini, L. & Malabarba, L. R. Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). *Ciência e Cultura.* 1990,42: 452–452.
- Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica.* 2012; 139:1273.
- Felsenstein, J. ‘Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap’, *Evolution.* 1985, Vol. 39, pp. 783–791.
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica.* 2003, 119:147-153.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics.* 1981; 31: 37-144.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo AS. Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica.* 1989, 79:107-114.
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, et al: The proto-oncogene *C-KIT* maps to canid Bchromosomes. *Chromosome Res.* 2005, 13: 113–122.

- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, Trifonov VA, Beklemisheva VR, Perelman PL, Graphodatsky DA, Trut LN, Yang F, Ferguson-Smith MA, Acland GM, Aguirre GD. The protooncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res.* 2005; 13:113-122.
- Gravena W, Teribele R, Giuliano-Caetano L, Dias AL. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández, Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brasil). *Braz. J. Biol.* 2007, 67: 905-908.
- Graves RA, Marzluff WF, Giebelhaus DH, Schultz GA. Quantitative and qualitative changes in histone gene expression during early mouse embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985, 82:5685–5689.
- Green DM, Zeyl CW, Sharbel TF. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *J. Evol. Biol.* 1993; 6: 417-441.
- Grenn, DM. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome.* 1990, 33:818-824.
- Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res.* 2004; 12: 143–151.
- Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999, 41:95-98.
- Hankeln T, Keyl HG, Ross R, Schmidt ER. Evolution of histone gene loci in chironomid midges. *Genome.* 1993, 36: 852–862.

- Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F. First report of a B chromosome in population of the *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). Gen. Mol. Biol. 2008, 31: 275-278.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) Cytogenetic and Gen. Res. 2011, 134:64-71.
- Henning F, Moyses CB, Calcagnotto D, Meyer D, Almeida-Toledo LF. Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*) Heredity. 2011; 106, 391–400.
- Hewitt GM. Grasshoppers and crickets. In: Animal Cytogenetics, Vol. 3, Insecta 1. Gebrüder Borntrager, Berlin-Stuttgart. 1979.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. Experientia. 1980; 36: 1014-1015.
- Hu L, Sham JS, Tjia WM, Tan YQ, Lu GX, Guan XY. Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. Genomics. 2004; 83: 298-302.
- Jamilena M, Ruíz-Rejón C, Ruíz-Rejón M. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. J. Cell. Sci. 1994; 107:703-708.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruíz-Rejón M, Ruíz-Rejón C, Parker JS. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. Chromosoma. 1995; 104:113-120.
- Jesus CM, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), A species with B chromosomes. Genetica. 2003; 118: 25-3.
- Jones RN, Rees H. B Chromosome. Academic Press, London. 1982.

- Jones RN. B-Chromosome drive. *Am. Nat.* 1991, 137:430-442.
- Jones N, Houben A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science.* 2003; 8:417-423.
- Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980, 16:111-120.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1989, 86; 6196-6200.
- Levan A, Fredga K, Sandbreg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52: 201-220.
- Li YC, Cheng YM, Hsieh LJ, et al. Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma.* 2005; 114: 28-38.
- Lima- Filho PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF. Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 2012; Vol 434-435: 63-70.
- Long H, Qi ZX, Sun XM *et al.* Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *J. Integr Plant Biol.* 2008; 50: 183-189.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM, Camacho JPM. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 1994; 2: 87-92.
- Loreto V, Cabrero J, López-Léon MD, Camacho JPM, Souza MJ. Possible autosomal origin of macho B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research.* 2008; 16: 233–241.

- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). BMC Genet. 2011, 12:65.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo L. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). Genetica. 1982, 87:101-106.
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). Genetica. 1998; 104: 1-7.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. Genetica. 2000; 108: 119-12.
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F. Cytogenetic analysis of A, - B- chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). Cytologia. 2004; 69: 181-186.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, et al. X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. Chrom Res. 1989; 12: 767-776.
- Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics. 2004, 20: 2471–72.
- Martins C, Galetti Jr. PM. 2001. Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? Genetica, 111: 439-446.
- Matsubara K, Yamada K, Umemoto S, Tsuchiya K, Ikeda N, Nishida C, Chijiwa T, Moriwaki K, Matsuda Y. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean

- field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia) Chromosome Res. 2008; 16: 1013-1026.
- McAllister BF, Werren JH. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma. 1997; 106:243–253.
- McQuade L, Hill R, Francis D. B chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans*(Marsupialia, Pseudocheiridae). 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. Cytogenet Cell Genet. 1994; 66: 155-161.
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. Nature Genetics. 1992; 1: 24-2.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity. 2000; 85: 1-9.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity. 2000; 85: 1-9.
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. Science. 1991; 254:1773-1776.
- Miyazawa CS, Galetti Jr. PM. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). Cytologia. 1994; 59: 73-79.
- Moraes VPO, Carneiro JS, Dias AL. B chromosomes in four different population of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): A comparative study of frequency and distribution. Folia biologica (Kraków). 2009, 57:3-4.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Cytologia. 2001, 66:59-64.

- Mühlmann-Diaz MC, Christian AT, Bedford JS. Chromosom microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Wiirzburg, Germany. 1995.
- Muñoz-Pajares AJ, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM, Perfectti F. A Single, Recent Origin of the Accessory B Chromosome of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics*. 2011, 187: 853–863.
- Neusser M, Münchb M, Anzenbergerb G, Müllera S. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by crossspecies chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res*. 2005; 108: 191-196.
- Noletto RB, Amorin, AP Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*. 2009; 75: 448-453.
- Nuntakarn L, Mevatee U, Withyachumnarnunkul B, Leardkamolkarn V, Fuchareon S. Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*. 2002; 28: 1-9.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet*. 1988; 11: 577-624.
- Oliveira C. & Foresti, F. (1993). Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios*. 1993, 76: 183–186.
- Oliveira C, Nircho M, Granado A, Levy S. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus Kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei:Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*. 2003, 1:47-52.

- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Fish Cytogenetics. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. eds. Enfield, Science Publisher, Inc. 2007; 111-164.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS: Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochemist*. 2009, 35:81–100.
- Oliveira LN, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*. 2011; 4:24.
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotrop Ichthyol*. 2010; 8:77-86.
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F: Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *J Fish Biol* 2011a, 78:183-194.
- Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F: Karyotypic conservatism in samples of *Characidium cf. zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genet Mol Biol* 2011b, 34:208-213.
- Pauls E, Bertollo LAC. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of cariotipic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*. 1990, 81:117-123.
- Pauls E, Bertollo LAC. Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*. 1983, 36: 307-314.

- Pawlowska TE, Taylor JW. Arbuscular mycorrhizal fungi: hyphal fusion and multigenomic structure (reply). *Nature*. 2005, 433: E4–E4.
- Pendás AM, Morán P, Martínez JL, García-Vásquez E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*. 1995, 4: 275 – 276.
- Pendás AM, Morán P, García-Vásquez E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*. 1994, 103:147–152.
- Perfectti, F. & J.H. Werren. The interspecific origin of B-chromosomes: experimental evidence. *Evolution*. 2001; 55: 1069–1073.
- Pineau P, Henry M, Suspène R, Marchio A, Dettai A, Debruyne R, Petit T, Lécu A, Moisson P, Dejean A, Wain-Hobson S, Vartanian JP. A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol*. 2005; 22:582–588.
- Pinhal D, Araki CS, Gadig OBF, Martins C. Molecular organization of 5S rDNA in sharks of the genus *Rhizoprionodon*: insights into the evolutionary dynamics of 5S rDNA in vertebrate genomes. *Genetics Research*. 2009, 91: 61-72.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83:2934-2938.
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C. The B chromosome of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbor 18S rRNA gene copies. *BMC Genetics*. 2010; 11:1-8.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998, 14:817–818.
- Pukkila, P. J. & Skrzynia, C. Frequent changes in the number of reiterated ribosomal RNA genes throughout the life cycle of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Genetics*. 1993, 133:203-211.

- Ranz JM, González J, Casals F, Ruiz A. Low occurrence of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila*. *Evolution*. 2003, 57:1325–1335.
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV *et al.* Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 106: 289-294.
- Ruiz-Estévez M, M^a Dolores López-León, Cabrero J, Camacho JPM. B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e36600.
- Salvador LB, Moreira-Filho O. B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*. 1992, 69:50-56.
- Sapre AB. & Deshpande DS. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.* 1987, 78.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M & Parzefall J. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*. 1995, 373: 68-71.
- Schienman JE, Lozovskaya ER, Strausbaugh LD. *Drosophila virilis* has atypical kinds and arrangements of histone repeats. *Chromosoma*. 1998, 107:529–539.
- Schmid, M., Ziegler, C. G., Steinlein, C., Nanda, I. & Schartl, M. Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research* . 1990,14: 231–242.
- Sharbel TF, Pijnacker LP & Beukeboom L W. Multiple supernumerary chromosomes in the pseudogamous parthenogenetic flatworm, *Polycelis nigra*: lineage markers or remnants of genetic leakage? *Genome*. 1987, 40: 850-856.

- Sharbel TF, Green DM, Houben A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome*. 1998, 41: 14-22.
- Silva AR, Maistro EL. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium*(Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado river, Minas Gerais, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29: 459-46.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol*. 2008; 57:758–771.
- Stitou S, De la Gaurdia RD, Jiménez R, Burgos M. Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosome of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae) implications for their origin and evolution. *Chrom. Research*. 2000; 8:305-311.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 1972; 75: 304-306.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24:1596-1599.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria* *Chromosome Research*. 2009; 17: 11-18.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and Chromosome Painting of X and B Chromosomes in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 125:286–291.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*. 2010; 119:217-225.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F, Higgins, DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997, 24:4876-4882.

- Tremblay A, Li S, Scheffler BE, and Matthews BF. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2009, 6:163-174.
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI, Graphodatsky AS. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora) *Chromosome Res.* 2002; 10: 109-116.
- Tripputi P, Emanuel BS, Croce CM, Green LG, Stein GS, Stein JL. Human histone genes map to multiple chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986, 83:3185–3188.
- Turner PC, Bagenal EBD, Vlad MT, Woodland HR. The organization and expression of histone genes from *Xenopus borealis*. *Nucl Acids Res.* 1988, 16:3471–3485.
- Van Vugt JFA, Jong JH, Stouthamer R. The origin of a selfish B chromosome triggering paternal sex ratio in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai* *Proc. R. Soc. B.* 2009; 276: 4149–4154.
- Venere PC, Galetti Jr. PM, Miyazawa CS. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology.* 1999; 22:345-349.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica.* 2008; 134: 311–317.
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF. New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica.* 2011, 139:1073-1081.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic Cell Genet.* 1996, 74:70-75.

- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira O, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F. Cytogenetic Markers in Wild Population of Curimatá (*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. *Cytologia*. 2009, 74: 281–287.
- Voltolin TA, Senhorini JÁ, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F. Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Gen. and Mol. Biol.* 2011: 34:220-224.
- Ward RB, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2005; 360: 1847-1857.
- Wiltshire RN, Dennis TR, Sondak VK, Meltzer PS, Trent JM. Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 131: 97-103.
- White TJ, Bruns T LS, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego. 1990, pp 315–322.
- Xia X e Xie Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredit.* 2001, 92:371-373.
- Yang F, O'Brien PCM, Milne BS *et al.* A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*. 1999; 62:189–202.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A *et al.* B Chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics*. 2011; 7:e1002203.
- Yudkin DV, Trifonov VA, Kukekova AV, Vorobieva NV, Rubtsova NV, Yang F, Acland GM, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS. Mapping of KIT adjacent sequence on canid autosomes and B chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116:100-103.

- Zhang L, Bao Z, Wang S, Huang X, Hu J. Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica*. 2007, 130:193–198.
- Zhu HP, Lu MX, Gao FY, Huang ZH, Yang LP, Gui JF. 2010. Chromosomal localization of rDNA genes and genomic organization of 5S rDNA in *Oreochromis mossambicus*, *O. urolepis hornorum* and their hybrid. *Journal of Genetics*, 89: 163-171.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chrom. Res.* 2003; 11: 23-35.