

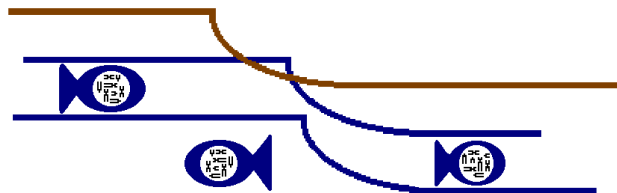
Ligia Carolina Quessada Corazza Bassetto

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS À
PRESENÇA DE CROMOSSOMOS B EM *Astyanax scabripinnis*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E GENÉTICA DE PEIXES
UNESP - BOTUCATU - SP



*“Nenhum problema pode ser resolvido
pelo mesmo estado de consciência que o gerou.
É preciso ir bem mais longe que isso”.*

Albert Einstein

Dedico este trabalho...

...Ao meu Marido Márcio

*...Aos meus pais José
Francisco e Maria Vicentina e ao meu
irmão Lisandro.*

Agradecimentos

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular, gostaria de agradecer de coração:

A DEUS, minha principal fonte de fé, força e inspiração.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti que, com firmeza e profissionalismo, sabiamente me orientou e incentivou na busca dos meus objetivos. Obrigada por confiar na minha capacidade de conduzir mais este trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira pelo grande apoio, críticas e sugestões, incentivo e, acima de tudo, grande amigo.

A Profa. Dra. Irani Quagio-Grassioto pela amizade e constante incentivo nos momentos que precisei.

A Profa. Dra. Silvia Regina Rogato pelo seu exemplo como pesquisadora, que carinhosamente me recebeu em seu laboratório e disponibilizou equipamentos que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

A empresa Eppendorf, por disponibilizar o micromanipulador que foi indispensável para a realização de parte deste trabalho e, em especial à Ana Paula, pelo incentivo e amizade. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. César Martins e a Prof. Dra. Adriane Wasko pelas sugestões, presença constante em minha vida acadêmica e pela amizade.

Ao Prof. Alejandro Laudicina do Laboratório de Citogenética Molecular, Comisión Nacional de Energía Atómica, de Buenos Aires-Argentina, por me ensinar pacientemente à técnica de microdissecação cromossômica.

A seção de Pós-graduação da UNESP de Botucatu, pelos pacientes e competentes serviços prestados, especialmente à Luciene, Marcinho, Maria Helena e Serginho.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Morfologia que, de alguma maneira, ajudaram na construção do meu caminho científico. Em especial à Dona Tera e a Dona Iolanda, aos técnicos Renato e José Luis, à secretária Luciana, obrigada pela amizade e dedicação.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do instituto de Biociência, UNESP, pela convivência, auxílio e amizade durante todos esses anos. Em especial ao Alex, Andréia Alves, Prof. Celso, Emanuel, Fernada, Gleisy, Heraldo, Welley e Zeca, pelo grande incentivo, dedicação, pelos almoços na copa e acima de tudo sempre presentes nos momentos que mais precisei.

Aos companheiros do Laboratório NEOGENE, da Faculdade de Medicina, desta mesma instituição, pelo auxílio recebido, em especial a Greice e ao Rodrigo, que com paciência disponibilizaram parte do seu tempo comigo.

Ao meu Marido Márcio, que com paciência, companheirismo, incentivo, carinho e muito amor, acompanhou e apoiou todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho. TE AMO!

Aos meus pais que admiro muito, José Francisco e Maria Vicentina, que sempre me conduziram pelo melhor caminho e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, mesmo não gostando delas. Sem vocês eu não seria nada!

Ao meu irmão Lisandro e minha futura cunhada Patrícia que, mesmo distante, sempre torceram por mim em todos os momentos de minha vida. Podem contar comigo sempre!

Aos meus sogros, Antonio e Marcelina, por estarem sempre presentes para os quais tenho muita consideração e carinho, obrigada por tudo!

Aos meus cunhados, Maurício e Elidia, pelos momentos de alegria.

À minha amiga e comadre Patrícia Elda, pelos inúmeros conselhos, pela ajuda nos momentos em que mais precisei, Obrigada! Não poderia deixar de

mencionar aqui as alegrias e diversões proporcionadas nos momentos de descontração dentro e fora do laboratório. Você é minha irmã de alma!

Aos meus amigos Ricardo e Greice, pelas trocas de experiências, pelo incentivo que muito ajudaram em minha formação profissional. Obrigada por estarem sempre presentes nos momentos em que mais precisei, e principalmente pelos momentos de alegrias. Meu eterno carinho e amizade.

Aos Meus compadres e comadres: Pedro e Mara, e claro o Pedrinho que está chegando, por sempre dividirem comigo os melhores e também os piores momentos dessa minha caminhada, trazendo uma palavra amiga; os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus nonos, Antonio e Carolina que com muita simplicidade e dedicação, sempre estiveram presentes dando exemplo de vida durante todos estes anos. Obrigada por existirem!

Aos meus primos Evandro e Fernanda, que sempre estiveram presentes em todos os momentos e com os quais sempre pude contar.

A minha prima Audrey, pelos momentos relaxantes proporcionados pelas mãos de fada, pelas conversas, pelo carinho e amizade. Torço por você!

Aos meus amigos Ana Maria, Luciano e Alison, por sempre estarem do meu lado trazendo alegrias. Obrigada pela amizade!

A associação de produtores rurais ARGB, da qual faço parte com orgulho, por disponibilizar o escritório e a Internet para as minhas inúmeras pesquisas.

E enfim, a todos os meus familiares, Quessada, Corazza e a minha mais nova família Bassetto, na qual fui muito bem recebida por todos. Obrigada por tudo!

Sumário

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Desenvolvimento da citogenética em peixes.....	2
1.2. Cromossomo Supranumerário ou B.....	6
1.2.1. Primeira descrição de Cromossomos B.....	7
1.2.2. Cromossomos B: características específicas.....	7
1.2.3. Características morfológicas dos cromossomos B.....	11
1.2.4. Ocorrência de cromossomos B e tamanho do genoma.....	12
1.2.5. Frequência de cromossomos B.....	15
1.2.6. Comportamento meiótico dos cromossomos B.....	18
1.2.7. Herança de cromossomos B	20
1.2.8. Manutenção dos cromossomos B.....	22
1.2.9. Estrutura e composição do cromossomo B.....	23
1.2.10. Origem e evolução dos cromossomos B.....	25
1.2.11. Efeito dos cromossomos B	29
1.2.12. Perspectivas.....	31
1.3. Estudos genéticos na espécie <i>Astyanax scabripinnis</i>	31
1.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD.....	37
1.5. Microdissecação cromossômica.....	49
1.6. Sequências Repetitivas.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAIS.....	50
4. MÉTODOS.....	50
4.1. Preparação Cromossômica.....	50
4.1.1. Estimulação de mitoses.....	50
4.1.2. Preparação de cromossomos mitóticos.....	50
4.1.3. Bandamento C.....	51
4.2. Microdissecação Cromossômica.....	51
4.2.1. Agulhas ou Micropipetas.....	51
4.2.2. Microdissecação.....	53

4.2.3. SCOMP (single cell comparative genomic hybridization).....	52
4.3. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente.....	56
4.4. Extração de DNA.....	58
4.5. A técnica de RAPD-PCR.....	59
4.6. Purificação de DNA.....	60
4.7. Isolamento de DNA repetitivo.....	60
4.8. Clonagem.....	61
4.9. Seqüenciamento nucleotídico.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
Capítulo I: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS À PRESENÇA DE CROMOSSOMOS B EM <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) ATRAVÉS DE RAPD.....	68
Referências do capítulo I	86
Capítulo II: IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO EM <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) UTILIZANDO MICRODISSECAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	90
Referências do capítulo II.....	104
Capítulo III: MAPEAMENTO DE SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA EM CROMOSSOMOS B DE <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).....	107
Referências do capítulo III.....	123
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

RESUMO

Nos últimos 20 anos, várias informações sobre as características dos cromossomos B têm sido acrescentadas, com diferentes tipos de abordagens, em diversos grupos de organismos, com a finalidade de se entender a origem e possíveis funções desses elementos genômicos nos indivíduos que os possuem. A presença de cromossomos B em peixes não é um evento raro e sua ocorrência têm sido descrita em um grande número de espécies. Embora já existam diversos estudos identificando características estruturais e moleculares relacionadas aos cromossomos B em peixes, estes dados ainda são pouco expressivos, principalmente levando-se em consideração a grande diversidade de espécies deste grupo de vertebrados. Portanto, este estudo visa contribuir com informações sobre os macrocromossomos B de *Astyanax scabripinnis* com o uso de técnicas citogenéticas e moleculares, buscando melhor compreender a estrutura e constituição destes segmentos genômicos e dos mecanismos envolvidos na sua origem e evolução nesta espécie. A partir de preparações cromossômicas de *Astyanax scabripinnis* foram separados os indivíduos portadores de cromossomos B dos não portadores, capturados no córrego Cascatinha componente da bacia hidrográfica do rio Tietê e no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), componente da Bacia Hidrográfica do Paranapanema (SP), no município de Botucatu, SP, os quais foram submetidos a procedimentos de análise citogenética e molecular. A amplificação do DNA desses indivíduos por RAPD foi uma das estratégias utilizadas para isolar seqüências presentes nos cromossomos B. As sondas AsRI e AsRVII produzidas a partir da banda diagnóstica, apresentaram homologia com o cromossomo B dos indivíduos da população do córrego Cascatinha, sendo que nenhuma marcação destas sondas foi evidenciada nos cromossomos B dos indivíduos coletados no Riacho da Madalena e nos cromossomos do complemento normal dos indivíduos de ambas as localidades. Uma outra estratégia realizada para a obtenção de sondas específicas de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis* foi através da microdissecação cromossômica e amplificação dos fragmentos de DNA por

SCOMP. A sonda obtida, AsMB, foi hibridizada por microFISH em preparações cromossômicas dos mesmos indivíduos dos quais os cromossomos B foram microdissecados, revelando marcações conspícuas ao longo do cromossomo supranumerário, sugerindo aparente amplificação preferencial de algumas regiões desses cromossomos. Os DNAs desses indivíduos também foram submetidos à fragmentação em autoclave para posterior subclonagem. Um clone escolhido aleatoriamente, B34 α , foi caracterizado. A localização cromossômica da sonda AsB34 α por FISH está nitidamente presente em vários cromossomos do complemento A, que apresentou padrões similares aos obtidos pelo bandamento C em preparações de indivíduos de ambas as populações, além de uma marcação intersticial somente no cromossomo B dos indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena. Contudo, não foi possível observar este mesmo padrão nos cromossomos do complemento A de indivíduos não portadores de cromossomos B para ambas as populações. A ausência deste tipo de marcação em indivíduos não portadores de cromossomos B pode estar relacionada com a organização destas seqüências repetitivas, sugerindo um possível efeito dos cromossomos B sobre o genoma desta espécie. Devem ser consideradas as possibilidades da ausência de marcação ser decorrente da inexistência destas seqüências ou do fato de estarem dispersas nos indivíduos sem cromossomo B, não possibilitando sua detecção por esta técnica. Os resultados obtidos acrescentam informações sobre o processo de diversificação cromossômica em *Astyanax scabripinnis*, bem como sobre os mecanismos relacionados à estrutura molecular dos cromossomos B nesta espécie, sugerindo possível evolução independente deste segmento genômico nos indivíduos portadores das duas localidades. O mapeamento dessas sondas em outras populações de *Astyanax scabripinnis* possibilitará compreender melhor a estrutura e diferenciação dos cromossomos B moldados pelos processos de evolução molecular.

PALAVRAS CHAVES: Characidae, *Astyanax scabripinnis*, RAPD, microdissecação, DNA repetitivo.

ABSTRACT

In the last 20 years, much information about B chromosomes characteristics have been enlarged, with different kinds of approaches, in diverse organism groups, have been investigated in order to understand the origin and possible functions of these genomic elements. The B chromosome presence in fishes is not a rare event, and its occurrence has been described in a great number of species. Although there are a lot of studies identifying structural and molecular characteristics related to B chromosome in fishes these data are few expressive, especially considering the great diversity of this vertebrate group species. Therefore, the goal of this study was to contribute with some information about the *Astyanax scabripinnis* B chromosome using cytogenetics and molecular techniques, and to search for a better comprehension of structure and constitution of these genomic segments, and of the mechanisms involved in the origin and evolution of these chromosomes in this fish species. From *A. scabripinnis* chromosome preparation, it was possible to separate carrier and non-carrier B chromosome individuals, which were sampled on Cascatinha stream, belonging to hydrographic basin of Tietê River, and on Água da Madalena wide stream, belonging to hydrographic basin of Paranapanema River, Botucatu, SP. The DNA amplification of these samples, using RAPD strategy, was applied to isolate sequences present on B chromosomes. The AsRI and AsRVII probes, which were produced from one diagnostic band, showed homology with B chromosome of Cascatinha stream individuals. Using these same probes, no signal was observed in the B chromosomes of Madalena wide stream individuals and no signal could be observed in the normal complement chromosomes of individuals from two localities. Another strategy applied to obtain specific probes for *A. scabripinnis* B chromosomes was chromosome microdissection and DNA fragments amplification using SCOMP. The obtained probe, AsMB, was hybridized by micro FISH in chromosome preparations of the same individuals, which B chromosomes were microdissected, revealing prominent signals along the B chromosome. This suggests a preferential amplification of some B chromosome regions of these

samples. The DNA of these individuals was submitted to autoclave fragmentation and after this, was subcloned. A randomly selected clone, B34 α , was characterized. The chromosome localization of AsB34 α probe was determined by FISH, and some signals were observed in many A complement chromosomes, which showed similar patterns to C banding in chromosome preparation of both population samples. In addition, the experiments showed an interstitial signal in B chromosomes of Água da Madalena wide stream individuals. However, it was not possible to visualize the same signal pattern in the A complement chromosomes of non-carrier B chromosomes individuals from both populations. The absence of this kind of signals in non-carrier B chromosomes individuals may be related with the organization of these repetitive sequences, suggesting a possible B chromosome effect on this specie genome. On the other hand, the signal absence may be associated with lack of these sequences or with the fact that it may be spread on non-carrier B chromosomes individuals' genome, and then, it is not possible to detect any signal by this method. These results added information about the chromosome diversification process in *A. scabripinnis*, and about the mechanisms related with B chromosomes molecular structure in this species, suggesting a possible independent evolution of this genomic fragment in the carrier B chromosome individuals of both localities. The probe mapping in other *A. scabripinnis* population will be important to better understanding of structure and B chromosomes differentiation, shaped by molecular evolution processes.

KEY WORDS: Characidae, *Astyanax scabripinnis*, RAPD, microdissection, repetitive DNA.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento da citogenética de peixes

Nas últimas décadas, a citogenética de peixes tem passado por modificações significativas, apresentando um grande desenvolvimento com a introdução de novas técnicas de preparação e análise cromossômica, contribuindo para estudos filogenéticos, taxonômicos e também para maior compreensão da estrutura e composição cromossômica. Estes estudos tiveram notáveis avanços a partir do final da década de 70 com a utilização da técnica de suspensão celular (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1981; Al Sabti *et al.*, 1983; Moreira-Filho & Bertollo, 1990; Foresti *et al.*, 1993, entre outros).

Uma primeira revisão sobre dados citogenéticos em peixes Neotropicais realizada por Almeida-Toledo (1978) inclui números haplóides e diplóides de 252 formas de peixes de água doce. Oliveira *et al.* (1988) descreveram um aumento deste número para 421 espécies, distribuídas em 141 gêneros e 32 famílias de peixes de água doce. Oliveira *et al.* (2000) realizaram outra revisão, na qual foram registradas 921 espécies, distribuídas em 252 gêneros, 44 famílias de peixes de água doce, possibilitando observar um grande aumento do número de indivíduos analisados citogeneticamente. Recentemente, Oliveira & Nirchio, (2006) relacionaram 1.047 espécies, sendo 47 famílias e 278 gêneros de peixes de água doce e 109 espécies de peixes marinhos, pertencentes a 39 famílias e 73 gêneros, dados estes que estão disponíveis na Internet e são atualizados periodicamente nos sites:

www.ibb.unesp.br/laboratórios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf

www.ibb.unesp.br/laboratórios/Marine%20Neotropical%20fishes.pdf

Os peixes neotropicais apresentam uma grande variabilidade cariotípica, seus números diplóides variam de $2n=20$ em *Pterolebias longipinnis* até $2n=134$ em *Corydoras aeneus* Oliveira & Nirchio, (2006). Contudo, estudos realizados no gênero *Corydoras*, têm mostrado a ocorrência de diversos citótipos em distintas localidades, como em, *Corydoras nattereri* em que foram encontrados três citótipos, com $2n=40$, $2n=42$ e $2n=44$ (Oliveira *et al.*, 1990). Pode ser observada uma condição

similar no grupo dos Characidae, no qual foi constatada na espécie *Astyanax scabripinnis* a presença de três citótipos diferentes em uma mesma população do riacho Água da Madalena (SP) com $2n=50$, $2n=48$ e $2n=46$ cromossomos (Maistro *et al.*, 2000; Vieira, 2001). Na família Callichthyidae, diversos citótipos tem sido descritos até o momento para espécie *Callichthys callichthys*, com números diplóides variando entre $2n=52$ a $2n=58$ (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005). Alguns grupos de peixes como Erythrinidae e Synbranchidae, também têm apresentado vários exemplos dessa diversidade cromossômica, além de outros que apresentam, de certa forma, conservados em relação ao número cromossômico e a fórmula cariotípica, como em Prochilodontidae, Characidae dentre outros, segundo Oliveira & Nirchio (2006).

A triploidia natural é outro tipo de variação cromossômica encontrada em diversas populações de diferentes espécies de peixes diplóides como descrita em *Salmo gairdneri* (Cuéllar & Uyeno, 1972; Thorgaard, 1983) *Astyanax schubarti* (Morelli *et al.*, 1983), *Curimata modesta* (Venere & Galetti Jr., 1985), *Eigenmannia* sp. (Almeida-Toledo *et al.*, 1985; Borin *et al.*, 2002), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1990) e *Astyanax scabripinnis* (Maistro *et al.*, 1994b; Fauaz *et al.*, 1994), indicando que há grande tolerância deste tipo de alteração numérica em algumas espécies deste grupo. Venkatesh (2003) destaca ainda que a poliploidização seja um evento crucial para a evolução dos genomas de peixes, podendo levar as diferentes formas e tamanhos dos cromossomos.

Os estudos citogenéticos de peixes neotropicais, em sua maioria foram realizados com aplicação de técnicas que compreendem a coloração convencional dos cromossomos pelo Giemsa, a caracterização do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (Banda-C), descrita por Sumner (1972) e a detecção das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação com nitrato de prata (NOR), segundo Howell & Black (1980). Com a descoberta de uma crescente e ampla diversidade no grupo dos peixes, tornou-se necessária a implantação de novas técnicas de bandeamentos cromossômicos em peixes, técnicas que podem fornecer maiores detalhes sobre a morfologia, comportamento e estrutura dos cromossomos.

Pode-se destacar algumas das técnicas que têm sido aplicada nos cromossomos mitóticos dos peixes, como a Banda R (5-Bromodeoxiuridina), em que a incorporação da 5-BrdU, um análogo da timina que substitui essa base no DNA quando presente pode permitir a detecção das regiões que apresentam replicações tardias, característica das regiões heterocromáticas descritas por Goldman *et al.* (1984); a coloração por fluorocromos específicos (Quinacrina, Cromomicina (CMA₃), Mitramicina, DAPI) vem se mostrando muito útil na identificação de regiões cromossômicas ricas em AT ou CG, dependendo de sua especificidade (Schmid, 1980; Schweizer, 1981; Amemiya & Gold, 1986; Bella, 1993); a indução de bandeamento cromossômico pelo tratamento por endonucleases de restrição (Banda R), enzimas que clivam o DNA em sítios específicos, localizando seqüências repetitivas, tornando-se um recurso bastante útil na localização e estudo da composição cromossômica (López-Fernandes *et al.* 1991; Maistro *et al.*, 2000). A Banda-G (Gold *et al.*, 1990) utilizada para identificar regiões eucromáticas (regiões relativamente ricas em AT) em cromossomos, principalmente nos mamíferos (Albuín *et al.*, 1996; Bertollo *et al.*, 1997; Vasconcelos & Martins-santos, 2000; Nirchio *et al.*, 2004, entre outros), a HSS (*hot saline solution*) descrita por Artoni *et al.* (1999), além da hibridação “in situ” fluorescente (FISH) descrita inicialmente por Pinkel *et al.* (1986), que utiliza sondas de DNA, podendo fornecer informações sobre a localização de genes, de seqüências repetitivas ou de segmentos cromossômicos específicos (Haaf *et al.*, 1993; Mestriner *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2002).

Os estudos de cromossomos meióticos pela técnica de análise do complexo sinaptonêmico, também têm proporcionado relevantes contribuições nos estudos citogenéticos em peixes (Foresti *et al.*, 1993; Dias *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1998). podem se constituir numa importante ferramenta para o entendimento de processos determinantes de modificação cromossômica e de especiação. Borin *et al.* (2002) analisaram 50 cariótipos de *Trichomycterus davisi*, $2n=54$, sendo um indivíduo triploide macho com $3n=81$ cromossomos, e o pareamento cromossômico desse indivíduo observou-se que havia pareamento anormal

dos diferentes genomas, o que provavelmente levaria à esterilidade desse macho.

Segundo Almeida-Toledo *et al.* (2000) a variabilidade cromossômica em peixes neotropicais é extraordinária quanto ao número e fórmula cromossômica, além da ocorrência de diferentes sistemas cromossômicos de determinação de sexo, embora os sistemas morfológicamente indiferenciados sejam os predominantes. O sistema XX/XY, no qual o macho é heterogamético, foi descrito em *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 1988b) em *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta *et al.*, 1992), em *Hoplias cf malabaricus* (Bertollo *et al.*, 1979, Born & Bertollo, 2000), entre outras. O sistema ZZ/ZW, no qual a fêmea é heterogamética, é mais freqüente e parece ocorrer na maioria das espécies de peixes que apresentam dimorfismo cromossômico, como por exemplo, em algumas espécies do gênero *Leporinus* (Galetti Jr. & Foresti, 1987; Galetti Jr. *et al.*, 1995; Vênere, 1998; Molina *et al.*, 1998), em espécies do gênero *Triportheus* (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni *et al.*, 2001), em *Characidium cf fasciatum* (Maistro *et al.*, 1998a) em espécies do gênero *Cheirodon* da família Characidae (Nishiyama & Martins-Santos, 1996), entre outros. Mecanismos mais complexos envolvendo a presença de cromossomos sexuais múltiplos, embora menos comuns, também foram relatados. O tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ocorre em *Erythrinus erythrinus* (Silvestro & Margarido, 2001, Bertollo *et al.*, 2002), em *Hoplias cf. malabaricus* do Alto Paraná (Bertollo *et al.*, 1979; Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo & Mestriner, 1998), entre outros e do tipo ZZ/ZW_1W_2 que foi encontrado em *Apareiodon affinis* (Moreira-Filho *et al.*, 1980; Jesus & Moreira-Filho, 2000a e b).

Desta forma, a identificação de variações envolvendo tanto o número quanto a estrutura dos cromossomos dos peixes vem aumentando à medida que se ampliam os estudos citogenéticos nesses animais. A aplicação de novas metodologias aos cromossomos dos peixes, bem como uma revisão sobre os cromossomos B nesse grupo serão consideradas em tópicos especiais a seguir, por se tratarem de temas diretamente investigados neste trabalho.

1.2. Cromossomo supranumerário ou B

O termo “cromossomo B” inclui uma variedade de cromossomos extras que mostram uma heterogeneidade conspícua em sua natureza, comportamento e dinâmica evolutiva. Por esta razão, não existe uma definição propriamente dita sobre o que é cromossomo B, mas um consenso de definições, proposta por Camacho & Parker (1993), durante a primeira conferência sobre cromossomo B (visto em Beukeboom, 1994). Considerou que “Cromossomos B são cromossomos adicionais dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações em algumas espécies, que provavelmente se originaram dos cromossomos A, mas seguiram sua própria evolução”. Esta é uma definição altamente resumida da maior parte das propriedades dos cromossomos B (Camacho, 2005).

Existem ainda outras propriedades para complementar a definição e nomenclatura dos cromossomos B, proposta por diversos pesquisadores. A proposta feita por Lytle, 1991, diz que “os cromossomos B não são homólogos aos cromossomos do complemento padrão (chamados de cromossomos A)” e segundo Camacho (1993), “os cromossomos B podem persistir na população em alta frequência, parecem não portar elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, são geralmente heterocromáticos e não contêm muitos genes (exceto seqüências de rDNA)”. Jones (1995) define cromossomo B como “supranumerários dispensáveis que não se recombinam com nenhum dos cromossomos do complemento A e não seguem as leis da herança Mendeliana”. Além de outras propostas, como a de Östergren (1945) na qual “os cromossomos B são parasitas naturais”. Por algum tempo, essa interpretação parasítica coexistiu com a alternativa de que os cromossomos B são mantidos por proporcionar algum benefício para o organismo que os carregam (Camacho, 2005).

Contudo, o termo cromossomo B é recomendado para casos em que os cromossomos supranumerários apresentam relevante frequência na população (Jones & Rees, 1982) e seu número pode variar entre diferentes células de um mesmo indivíduo em algumas espécies (Guerra, 1988). Dentre outras características, tem sido verificado que os cromossomos B podem

interferir em características críticas para as espécies, como no pareamento de homólogos do complemento A, podem influenciar na frequência de quiasmas ou na fertilidade dos gametas, ou ainda, aumentar o limite de transcrição de genes RNAr (Camacho, 2005). Nesses casos, considera-se que tais cromossomos poderiam conferir uma desvantagem adaptativa para a espécie (Guerra, 1988). Além disso, existem mecanismos capazes de controlar o número de cromossomos B em determinados órgãos ou de favorecer a sua transmissão gamética, podendo apresentar alguma importância para as espécies, sem, contudo, serem portadores de genes que determinam alterações fenotípicas (Camacho, 2005).

1.2.1. Primeira descrição de Cromossomos B

Os cromossomos B foram identificados há mais de 100 anos atrás, nos primórdios da citogenética, tendo seus primeiros relatos descritos por Wilson (1906) que observou a presença de cromossomos extras no complemento cariotípico em insetos do gênero *Metapodius*, assim como Stevens (1908) encontrou estes cromossomos em *Diabrotica* e mais tarde Kuwada (1915) observou em milho (*Zea Mays*). A partir dessas observações, diferentes nomes foram sugeridos para descrever esses cromossomos supranumerários, incluindo “fragmento extra cromossômico” (Müntzing, 1944; Östergren, 1945), “cromossomos supérfluos” (Håkansson, 1945) e “cromossomos acessórios” (Håkansson, 1948). Em 1928, Randolph foi o primeiro a propor o termo “cromossomo B” para designar os cromossomos adicionais àqueles considerados de ocorrência comum, do complemento A, e que é muito utilizado atualmente. (cit. In Camacho, 2005).

1.2.2. Cromossomos B: características específicas

Os cromossomos B representam uma alta classe de heterogeneidade cromossômica com muitas peculiaridades e desde a sua descoberta tem chamado bastante atenção, pois são dispensáveis, de origem e função misteriosa e possuem ampla ocorrência, tornando-se um atrativo para a pesquisa. Os cromossomos B ocorrem em diferentes tipos de organismos desde fungos até em representantes de todos os maiores grupos

de plantas e animais (Jones & Rees, 1982), sendo comum sua presença em nível de famílias, gêneros, espécies e populações (Jones, 1991). Pelo fato de estarem presentes em alguns indivíduos e em algumas populações, são provavelmente originados dos cromossomos A, mas não se recombinam com eles, aparentemente seguindo sua própria evolução (Camacho, 1993).

A ocorrência de cromossomos B dentro de uma população pode ser esporádica ou, como comumente encontrado, para muitas espécies, pode mostrar uma alta frequência entre os indivíduos. Podem também exibir variações em relação à morfologia, tamanho e número desses elementos (Cavallaro *et al.*, 2000). Estas variações em tamanho e morfologia indicam que os cromossomos B estão mudando e assim, provavelmente, novas variações serão encontradas e podem ser herdadas, aumentando a probabilidade do aparecimento de B polimórficos (Zurita *et al.*, 1998). Camacho (1993) revela que a distribuição geográfica dos indivíduos portadores do B pode estar relacionada com fatores ecológicos e históricos. Porém, a densidade populacional parece não estar relacionada com a frequência dos cromossomos B (Porto-Foresti *et al.*, 1997). Alternativamente, a estabilização da frequência de cromossomos B pode ser o resultado de uma seleção dirigida balanceada em que o aumento da frequência é reduzido por eliminação seletiva de indivíduos com altos números de cromossomos B (Cavallaro *et al.*, 2000).

Estes cromossomos parecem não portar elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Devido à ausência de pressão de seleção e acúmulo de mutação, a recombinação é evitada, o que leva à idéia de que exista pouco locus funcional nos cromossomos B (Green, 1990 e 2004). Além disso, Jones (1995) salienta que eles são geralmente heterocromáticos e que a variação da heterocromatina nos cromossomos B é muito maior do que no complemento normal. Porém, há casos em que os B são menos heterocromáticos que os cromossomos A ou eucromáticos, como encontrado em *Moenkhausia sanctafilomenae*, em que foi verificada uma pequena divergência em relação à presença de heterocromatina nos cromossomos B, sendo que nas populações dos ribeirões Capivara, Alambari e córrego Olaria todos os cromossomos B se

mostraram eucromáticos, enquanto nos exemplares da população do ribeirão Araquá a maioria dos cromossomos B se mostrou eucromático e apenas um B se mostrou parcialmente heterocromático (Sobrinho, 2006). Esta variação também foi encontrada por Venere *et al.* (1999) em caracídeos

Para melhor entender a estrutura final dos cromossomos B moldada pelos processos de evolução molecular é importante ressaltar a existência de genes nestes cromossomos, pois durante alguns anos, após sua descoberta se acreditava que não havia genes nos cromossomos B (Jones & Rees, 1982). Porém diferentes autores têm demonstrado a presença de genes nos cromossomos B, como genes envolvidos na organização de nucléolos (NOR) em gafanhotos da espécie *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero *et al.*, 1987), genes para a virulência em fungos da espécie *Nectria haematococa* (Miao *et al.*, 1991), genes da esterase em centeio *Secale cereale* (Bang & Choi, 1990), genes que codificam RNA ribossômico em plantas *Brachycome dichrosomatica* (Donald *et al.*, 1995) e *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1994). Em exemplares de peixes da espécie *Moenkhausia sanctafilomenae* do ribeirão Araquá foram detectados cístrons ribossomais com a utilização de sondas de DNAr 18S em um dos microcromossomo B (Sobrinho, 2006).

Aparentemente, a maioria dos genes encontrados nos cromossomos B não tem sua expressão confirmada. Contudo, Camacho *et al.* (2000) afirmam que a inatividade dos cromossomos B não deve ser somente considerada em termos de não codificação ou de não transcrição do DNA, mas também em termos da formação de complexos do DNA com proteínas ou com outras moléculas orgânicas, as quais poderiam afetar e serem afetadas pela estrutura física da cromatina. Como exemplo, podem ser citados os trabalhos de Leach *et al.* (1995) e Houben *et al.* (1997b) mostrando que os cromossomos B de *Brachycome dichrosomatica* são desacetilados em relação aos cromossomos do complemento padrão e em conjunto com a replicação tardia dos supranumerários, tornam-se geneticamente inertes. Também, os trabalhos de López-Leòn *et al.* (1991, 1995 a, b) com gafanhotos da espécie *Eyprepocnemis plorans*, bem como os trabalhos de Neves *et al.* (1992) em centeio da espécie *Secale cereale*, que

mostraram certo controle da expressão dos cromossomos B por meio de metilação.

Além de genes, as pesquisas utilizando técnicas de genética e citogenética molecular, a partir da década de 90, permitiram identificar várias seqüências específicas dos cromossomos B e estas seqüências são, em geral, responsáveis pela heterocromatinização dos cromossomos B após a sua origem, sendo ricas em AT (adenina e timina) e em seqüências repetitivas (Jones, 1995). Em vespa parasitóide *Nasonia vitripennis* diversas seqüências repetitivas foram isoladas, sendo três famílias de seqüências repetitivas (171-214pb) específicas de cromossomos B e uma família (94pb) homóloga aos cromossomos do complemento normal (Eickbush *et al.*, 1992), além de uma seqüência identificada como sendo um retrotransposon, denominado de NATE (Nasoni transposable element), encontrado no genoma de espécies relacionadas (McAllister, 1995; McAllister & Werren, 1997).

Segundo Camacho *et al.* (2004) os cromossomos B parecem ser responsáveis por vários efeitos nos indivíduos que os carregam. Além disso, estes autores afirmam ainda que existam amplas evidências de que indiretamente os cromossomos B podem afetar um amplo número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas como em animais. Como uma comparação, pode ser levantado o fato de que um cromossomo B metacêntrico está sendo encontrado em diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* de diferentes bacias hidrográficas, algumas localizadas a mais de 600Km de distância umas das outras. Além disso, a ocorrência de cromossomos B em populações com $2n=46$, 48 e 50 cromossomos demonstra o envolvimento deste cromossomo em processo de diferenciação cariotípica neste grupo, relacionando-se a origem do complexo *scabripinnis* (Moreira-Filho *et al.*, 2004).

Com o avanço das metodologias, de análise genética, estudos mais detalhados puderam ser relacionados nos diferentes grupos de organismos, expandindo o conhecimento sobre a distribuição dos cromossomos B, permitindo assim, a comprovação de sua presença em alguns eucariotos primitivos que não eram possíveis de serem analisados. A introdução da técnica de gel de eletroforese de campo pulsado (*pulse-field gel*

electrophoresis technique) possibilitou a descoberta desses cromossomos em algumas espécies de fungos (Covert, 1998). Contudo a possibilidade de se encontrar cromossomo B, em espécies nunca anteriormente descritas com esta peculiaridade, depende de probabilidades combinadas entre a origem e manutenção desses cromossomos (Camacho, 2005). Assim, o maior obstáculo para se estudar a distribuição dos cromossomos B e a sua variação entre as espécies estudadas ainda é a intensidade dos estudos citogenéticos, pois os cromossomos B, por definição, não estão presentes em todos os indivíduos de uma espécie ou população e ele pode ser encontrado posteriormente em indivíduos raramente estudados (Palestis *et al.*, 2004).

1.2.3. Características morfológicas dos cromossomos B

A similaridade relativa ao tamanho dos cromossomos do complemento padrão A vem sendo mantida criteriosamente para diferentes categorias de organismos (Volubojev, 1980; Vujosevic, 1993; Palestis *et al.*, 2004). Em geral, os cromossomos são menores que os cromossomos A, com tamanhos de $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ do tamanho destes e estes minúsculos elementos genômicos, também diferem dos cromossomos A no que diz respeito à posição do centrômero, de modo que são facilmente identificados nas suas células mitóticas (Jones, 1995). A grande maioria dos cromossomos B, independentemente do seu tamanho, são do tipo metacêntrico. Contudo, cromossomos B submetacêntricos também foram encontrados em *Nectomys squamipes* (Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998) e em *Astyanax scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2003, Neo *et al.*, 2000 a, b).

Os cromossomos supranumerários constituem uma coleção diversificada de cromossomos, que podem variar tanto na sua morfologia quanto no seu tamanho. Na espécie *Megaselia scalaris* foram encontrados cromossomos B extremamente pequenos, mas ainda conservando elementos característicos que os qualificam como cromossomos (Wolf *et al.*, 1991). Em ratos da espécie *Reithrodontomys megalotis* são encontrados cromossomos B pouco maiores, porém ainda menores que os cromossomos do complemento A (Peppers *et al.*, 1997) e ainda em *Uromys caudimaculatus* os cromossomos B são maiores do que os cromossomos A (Baverstock *et al.*, 1972).

É interessante observar que em peixes os cromossomos supranumerários apresentam grande diversidade no tamanho. Com base nestas características, Volubujev (1981) classificou-os em três tipos: microcromossomos B (cromossomos bem menores que os do complemento A), como aqueles encontrados em *Prochilodus lineatus* (cit. como *P. scrofa* por Pauls & Bertollo, 1983 e 1990; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006), *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989; Alberdi & Fenocchio, 1997; Portela *et al.*, 1998; Portela-Castro *et al.*, 2001; Portela-Castro & Júlio Jr., 2002; Dantas, 2002; Sobrinho, 2006) e *Poecilia formosa* (Schartl *et al.*, 1995; Lamtsch *et al.*, 2004); cromossomos B de tamanho médio (menores ou iguais em tamanho aos do complemento A), como em *Rhamdia hilarii* (Fenocchio & Bertollo, 1990); e os macrocromossomos B (iguais ou maiores que os do complemento A), caracterizados em *Astyanax scabripinnis paranae* (Maistro *et al.*, 1992, 1994a e b), *Rutilus rutilus* e *Alburnus alburnus* (Hafez *et al.*, 1981; Ziegler *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2006).

Hewitt (1979) foi o primeiro autor a observar que os cromossomos B maiores são mitoticamente estáveis e assim estão sempre em um mesmo número por célula por indivíduo. Esta característica também foi evidenciada em *Astyanax scabripinnis* (Maistro *et al.*, 2001). Por outro lado, os cromossomos de menor tamanho parecem exibir uma tendência à instabilidade mitótica e assim podem variar em número de célula para célula dentro do mesmo organismo, como descrito em *Prochilodus lineatus* (cit. como *P. scrofa* por Pauls & Bertollo, 1983 e 1990; Maistro *et al.*, 2000; Artoni *et al.*, 2006) e em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Sobrinho, 2006).

1.2.4. Ocorrência de cromossomos B e tamanho do genoma

A ocorrência de cromossomos B não é rara e têm sido descritas, em diversos organismos, desde fungos até em todos os maiores grupos de plantas e animais (Jones & Rees, 1982; Jones & Diez, 2004), sendo comum sua presença em indivíduos, espécies e populações (Jones, 1991). A exceção parece ocorrer em pássaros (Vujosevic & Blagojevic, 2004), onde somente uma espécie (*Taeniopygia guttata*) mostrou carregar um cromossomo acessório restrito à linhagem germinativa (Pigozzi & Solari, 1998). Os dados

de tamanho de genoma descritos na literatura revelam que os taxa com genomas maiores tendem a ter mais espécies portadoras de cromossomos B que aqueles com genomas menores (Palestis *et al.*, 2004). Estes relatos podem explicar a ausência dos B nas aves, uma vez que este grupo apresenta um genoma bastante reduzido (2 a 4 pg de DNA) e o menor conteúdo de seqüências repetitivas entre os vertebrados (15-20%) (Vujosevic e Blagojevic, 2004).

Uma possível explicação para a relação entre o tamanho do genoma e a presença de B seria a de que as espécies com genomas pequenos seriam menos capazes de tolerar a presença e o efeito desses cromossomos (Palestis *et al.*, 2004). Outra explicação corrente seria a de que nos grandes genomas, que contêm muito DNA não codificante, esse poderia ser fonte de origem dos B (Puertas, 2002). Entretanto, muitos dos casos em que ocorre cromossomo supranumerário tratam-se na verdade de alterações cromossômicas do tipo polissomia, quebras cromossômicas provocadas por agentes poluidores e até mesmo caso de polimorfismos cromossômicos recorrentes de hibridações interespecífica. Portanto, há necessidade do estabelecimento de alguns critérios de avaliação para que possa ser validada sua ocorrência (Moreira-Filho, comunicação oral). Jones e Rees (1982) recomendam que o termo cromossomo B seja empregado para aqueles casos onde os cromossomos supranumerários apresentam certa freqüência na população, representando, portanto uma característica da mesma.

Os primeiros relatos de cromossomo B em mamíferos foram observados na espécie *Petauroides volans* (cit. como *Schoinobates volans* por Hayman & Martin, 1965) e *Vulpes vulpes* (Moore & Elder, 1965). Hoje existem aproximadamente 55 espécies de mamíferos que apresentam cromossomos B, significando pouco mais de 1% das espécies conhecidas (Vujosevic & Blagojevic, 2004). Contudo, em anura existem apenas 10 espécies portadoras de cromossomo B pertencente a seis famílias diferentes (Medeiros *et al.*, 2006), sendo que a maior variação foi encontrada em sapos da Nova Zelândia da espécie *Leiopelma hochstetteri*, que apresentam indivíduos com mais de 16 cromossomos B (Green, 1988). Esta variação foi

atribuída à ocorrência de não-disjunção mitótica resultante da instabilidade durante a divisão celular (Medeiros *et al.*, 2006).

A presença de cromossomos B em insetos foi descrita pela primeira vez por Imai em 1974, em formigas da espécie *Leptothorax spinosior* que apresentaram de 1 a 12 cromossomos B. Anos mais tarde, de 6 a 11 cromossomos B foram descritos em *Podormyna adelaide* (Imai *et al.* 1977) e nas espécies *Pseudolasius* sp e *Prenolepis jerdoni* (Imai *et al.*, 1984). Palomeque *et al.* (1990 e 1993) mostraram a presença de cromossomos B em *Lasius niger* com variação numérica intra e interindividual. Mais recentemente, Lorite *et al.* (2000) mostraram a presença de cromossomo B em representantes da subfamília Myrmecinae. Além desta descrição, também em *Trypoxolon albitarse* (Araújo *et al.*, 2000, 2001) e em vespa da espécie *Thricogramma kaykai* (Stouthamer *et al.*, 2001) foram identificados cromossomos B.

No decorrer dos últimos 20 anos, várias informações têm sido acrescentadas sobre as características destes elementos genômicos em peixes, devido ao avanço das técnicas e métodos de estudo. A ocorrência de cromossomos B já foi detectada em cerca de 15% do total das espécies de peixes da fauna Neotropical que tiveram seus cariótipos estudados e continuamente está sendo encontrado nas espécies em estudo e certamente este não é o número final (Oliveira & Nirchio, 2006).

Enquanto para a maioria das espécies de peixes portadoras de cromossomos supranumerários este número é baixo, em outras, como na espécie *Callichthys callichthys* podem apresentar de 3 microcromossomos B em alguns indivíduos (Oliveira *et al.*, 1993) a 8 microcromossomo B (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005); outros indivíduos ainda apresentam células em que até 16 microcromossomos B podem estar presentes (Calcagnoto, 1989). Na espécie *Moenkhausia sanctafilomenae* todos os indivíduos apresentam microcromossomo supranumerário, com variação inter e intra-individual (Foresti *et al.*, 1989; Sobrinho, 2006).

A primeira ocorrência de cromossomo supranumerário com características pertinentes a cromossomos B em peixes da região neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus*

(cit. como *P. scrofa*) por Pauls & Bertollo (1983). A partir desse caso, muitos outros trabalhos demonstraram a ocorrência de cromossomos supranumerários em representantes de diferentes famílias de Characiformes, entre elas Parodontidae (Falcão *et al.*, 1984), Curimatidae (Venere & Galetti Jr, 1985; Oliveira & Foresti, 1993; Martins *et al.*, 1996; Venere *et al.*, 1999), Characidae (Salvador & Morreira-Filho, 1992, Foresti *et al.*, 1989) Anastomidae (Venere *et al.*, 1999) Ciclidae (Feldberg *et al.*, 2004). Além disso, cinco outras famílias desta ordem também foram reportadas contendo cromossomos supranumerários, entre as 21 espécies listadas por Salvador & Moreira-Filho (1992).

A ampla ocorrência dos cromossomos B nos mais variados organismos sugere a necessidade de estudos mais detalhados com uma amostragem mais ampla de indivíduos por população, especialmente nas que apresentam estes elementos genômicos em baixa frequência, afim de que se possa conhecer melhor a verdadeira distribuição e a participação dos cromossomos B nos processos determinantes da diversidade nos organismos (Camacho, 2005).

1.2.5. Frequência de cromossomos B

Os cromossomos B, como visto, podem variar em tamanho, mas também podem variar quanto ao número e à frequência dentro do cariótipo. Comum entre os diversos taxos, diferentes níveis de variações existem quanto à presença ou ausência de cromossomos B, intra e interindividual, intra e interpopulacional; porém, em alguns organismos esta variação pode ocorrer entre os diferentes tecidos, como em *Echymipera kalubu* (Hayman *et al.* 1969), em *Rattus rattus* (Gropp *et al.*, 1970) e em *Apodemous flavicollis* (Vujosevic & Blagojevic, 2004). O número de cromossomos B em diferentes indivíduos de uma população geralmente segue uma distribuição binomial, ou seja, depende do número de indivíduos portadores de cromossomos B e da quantidade de cromossomos B por indivíduo, podendo-se assim obter uma estimativa da frequência desses cromossomos nas populações que os carregam (Camacho, 2000).

Estudos populacionais da maioria das espécies de animais ou vegetais, portadoras de cromossomos B, têm mostrado uma grande variedade de situações. Em alguns casos os cromossomos B são difíceis de serem encontrados entre os diferentes indivíduos da população; em outras, são detectados baixos números de cromossomos B por indivíduo; por outro lado, ocorrem populações onde são encontrados indivíduos apresentando grandes quantidades de cromossomos B. Tais situações foram verificadas em alguns organismos, como em *Pachyphytum fittkai* em que foram encontrados 50 cromossomos B, enquanto no gênero Crassulacea os indivíduos possuem números similares (Uhl & Moran, 1973). Em certas plantas, foram encontrados 22 cromossomos B, como na espécie *Centaurea scabiosa* (Fröst, 1957), 26 em *Fritillaria japonica* (Noda, 1975), 32 *Zea mays*, (Jones & Rees, 1982), 31 em *Gibasis karwinskyana* (Kenton, 1991), entre outros. Em alguns animais, como em ratos da espécie *Apodemus peninsulae* (Volubujev & Timina, 1980) e em insetos Orthopteran da espécie *Xylotanemorum* (Boyes & Van Brink, 1967), foram encontrados 20 cromossomos B, enquanto em *Gonista bicolor* (Sannomiya, 1974) e em sapos da espécie *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988), foram encontrados 16 cromossomos B por célula. Estes valores extremos de número de cromossomos B são provavelmente indicativos da alta tolerância para estes elementos extras nessas espécies. Na maioria dos casos, contudo, o número de cromossomos B por indivíduos não é alto e a probabilidade de se encontrar indivíduos em plantas ou animais com mais de três ou quatro cromossomos B é rara (Camacho, 2005).

Nos exemplos conhecidos em peixes, o número de cromossomos supranumerários nos indivíduos é geralmente pequeno, sendo em torno de 1 a 2 por célula, com exceção das amostras de *Prochilodus lineatus* (cit. como *P. scrofa*) por Pauls & Bertollo (1983), que apresentam uma variação de até 5 microcromossomos por célula e *Callichthys callichthys* (Calcagnoto, 1989; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005), que apresentaram até 16 microcromossomos por célula. Em *Moenkhausia sanctafilomenae* também foi constatada uma grande variação na frequência dos microcromossomos B nas diferentes populações estudadas. Um estudo feito por Foresti *et al.*,

(1989), relatou a presença de 1 a 8 microcromossomos B, nesta espécie, enquanto em outras populações relatadas por Dantas (2002) apresentaram de 0 a 6 microcromossomos B, além da variação encontrada por Sobrinho (2006) de 0 a 9 microcromossomos B variando inter e intraindividualmente, nas preparações de ambos os sexos. Contudo, os indivíduos do rio Paraná analisados por Portela-Castro *et al.* (2001), apresentaram até 2 microcromossomos B, que foram encontrados somente em machos.

Estudos realizados por Oliveira *et al.* (1997) e Cavallaro *et al.* (2000) detectaram aumento da frequência do polimorfismo de cromossomos B na população natural de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu a qual apresentou de 0 a 7 microcromossomos B. Porém, a quantidade de células com diferentes números de B para cada indivíduo foi pequena. Isso indica um baixo grau de instabilidade mitótica para esses cromossomos, contrastando com alta instabilidade mitótica encontrada por Pauls & Bertollo (1983) em indivíduos com 0 a 5 cromossomos B. Para explicar esta variação, os autores consideram que, dois possíveis fenômenos puderam estar operando durante este período entre as avaliações, sendo estes a existência de um mecanismo de acumulação ou alternativamente um efeito benéfico desses cromossomos nos indivíduos que os carregam (Camacho *et al.*, 2004).

Segundo Oliveira *et al.* (1997), esses dados poderiam sugerir uma substituição do cromossomo B original por um variante com alta estabilidade mitótica ou a ocorrência de uma coadaptação progressiva entre os B e o genoma, levando à regularização do comportamento mitótico desses cromossomos. Ambos os processos poderiam resultar na fixação de um sistema estável de cromossomos B dentro de uma população. Lamtsch *et al.* (2004) utilizaram a técnica de *multicolor DNA fingerprinting* na análise da distribuição e estabilidade dos cromossomos supranumerários no genoma de *Poecilia formosa* em condições naturais. Os resultados obtidos apontam para a existência de um limite máximo para o número de cromossomos B em condições naturais nessa espécie. Além disso, de acordo com os autores, os microcromossomos em *P. formosa* são fontes adicionais de variabilidade genética, uma vez que esta geralmente se origina apenas por mutações nos organismos que se reproduzem por processos não convencionais.

1.2.6. Comportamento meiótico dos cromossomos B

Apesar da existência de um número relativamente grande de trabalhos publicados sobre a ocorrência e a frequência dos cromossomos B em fungos, plantas e animais, pouco se sabe sobre seu comportamento meiótico. É sabido que durante a meiose, cada cromossomo A pareia-se com seu homólogo para formar um bivalente na primeira divisão, com base nas leis de segregação Mendeliana. Todavia, os cromossomos B nem sempre formam pares de fato e matem seu próprio comportamento meiótico como um univalente durante a meiose, não seguindo as leis de segregação Mendeliana. Dessa forma, os univalentes são livres para segregarem preferencialmente para um pólo meiótico específico e por esse motivo, resultam numa alta transmissão (50%) proporcionada pela lei mendeliana (Camacho, 2005).

Em alguns aspectos, os cromossomos B são bastante similares aos cromossomos sexuais, apresentando processos de condensação-descondensação durante o ciclo meiótico, formação de univalentes (no caso de macho X0), entre outros, sugerindo que os processos de estruturação e fundamento de ambos os tipos de cromossomos poderiam ser intimamente relacionados (Camacho *et al.*, 2000). Porém, o comportamento meiótico é variável entre os diferentes cromossomos B, nos indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Rebolo *et al.* (1998) sugeriram a existência de “estratégia cromossômica” de adaptação para univalente, depois de analisar “*in vivo*” o comportamento meiótico em machos de alguns tipos de univalentes (X, B e A), tendo como resultado de seleção o aumento da efetividade de transmissão.

Os estudos meióticos em animais tiveram um desenvolvimento bastante intenso nas últimas décadas, devido à aplicação de metodologias de fácil execução, associado aos conhecimentos morfológicos, genéticos e bioquímicos. Devido ao comportamento do cromossomo B durante a meiose ser semelhante ao dos isocromossomos, a rápida diferenciação pode ser facilitada, tanto pela duplicação do genoma como pela inserção de elementos de transposição. Portanto, o cromossomo B durante o seu processo evolutivo vai se diferenciando do cromossomo do qual se originou de tal modo que sua

composição pode se tornar tão diferenciada que encontramos poucas ou até mesmo nenhuma homologia com as dos cromossomos A (Camacho *et al.*, 2000).

Em mamíferos, o comportamento meiótico dos cromossomos B tem sido investigado na sua maioria durante a espermatogênese. Os cromossomos B de algumas espécies “autopareiam-se” formando univalentes na primeira divisão meiótica; mas também são encontradas outras formações como de bivalentes simétricos e assimétricos e ainda multivalentes (Vujosevic & Blagojevic, 2004). Silva & Yonenaga-Yassuda (1998) observaram auto-pareamentos de univalentes na análise do complexo sinaptonêmico de *Nectomys squamipes*, indicando a presença de seqüências de DNA repetitivo. Em *Dicrostonyx groenlandicus* foram observados B univalentes, bivalentes e trivalentes fazendo associações com o cromossomo Y (Berend *et al.*, 2001).

Análises meióticas do complexo sinaptonêmico de cromossomos B em peixes Neotropicais visaram entender uma origem provável desses cromossomos, seja a partir de cromossomos do complemento padrão ou de eventos citológicos determinantes para a formação destes elementos genômicos nos estudos realizados em *Leporinus lacustris* (Mestriner *et al.*, 1995) e em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Portela-Castro *et al.*, 2001). Trabalhos com análises de complexo sinaptonêmico também foram realizados em machos de *Astyanax scabripinnis* carregando um cromossomo B do tipo metacêntrico e mostram claramente a ocorrência de 26 complexos perfeitamente pareados, ou seja, 25 correspondendo aos cromossomos do complemento padrão ($2n=50$) e o outro remanescente corresponde ao autopareamento do macrocromossomo B metacêntrico, demonstrando homologia funcional entre ambos os braços. Para complementaridade dos dados, a meiose convencional mostrou que o univalente B metacêntrico formou um anel nas células profásicas e esta configuração persiste até a metáfase I, sugerindo a existência de um quiasma distal entre os dois braços (Mestriner *et al.*, 2000). É possível que o autopareamento do univalente B possa estar associado com o aparecimento de diferentes padrões de

bandeamento C observados em macrocromossomos B metacêntricos (Neo *et al.*, 2000a).

1.2.7. Herança de cromossomos B

No que se diz respeito ao processo de transmissão dos cromossomos B durante a divisão celular, estes parecem não seguir o padrão de segregação comum Mendeliana, tendo um comportamento estável durante as divisões mitóticas ou meióticas, geralmente apresentando não-disjunção na anáfase (Jones, 1975). Não se sabe ao certo quais são as vantagens proporcionadas na transmissão do cromossomo B para a prole, mas a variedade de processos incluindo distorção de segregação é usualmente conhecida como “mecanismos de acumulação” ou simplesmente “direção”, que pode ocorrer em qualquer estágio durante o ciclo de vida, podendo ser pré-meiótico, meiótico ou pós-meiótico (Jones, 1991; Camacho *et al.*, 2000, dentre outros que serão explicados e exemplificados em seguida).

O processo de acumulação pré-meiótica acontece devido a não-disjunção do cromossomo B; assim, as duas cromátides são direcionadas para o mesmo pólo, ocorrendo um aumento do número de cromossomos B em células germinativas durante o desenvolvimento, para garantir a presença desses em seus descendentes (Chiavarino, *et al.*, 2000; Camacho, 2005). Este processo foi primeiramente descrito por Nur (1963), que observou o aumento de cromossomos B em células germinativas de gafanhotos da espécie *Calliptamus palaestinensis*, sugerindo que a não-disjunção mitótica correria na linhagem germinativa durante o desenvolvimento dos testículos. Este processo também foi observado em insetos da espécie *Locusta migratoria* (Kayano, 1971; Viseras *et al.*, 1990) e em plantas da espécie *Crepis capillaris* (Rutishauser & Röthlisberger, 1966), além da não-disjunção do cromossomo B durante a embriogênese nesses insetos (Pardo *et al.*, 1995).

Mecanismos de acumulação de cromossomos supranumerários durante a meiose dependem da assimetria funcional do produto meiótico. Num processo normal de meiose em fêmeas, uma das duas células

resultantes da divisão meiótica será inviável, denominada de corpúsculo polar. Assim os cromossomos de um complemento normal têm 50% de chance de serem eliminados dentro do corpúsculo polar, mas os cromossomos B podem controlar esse processo, migrando preferencialmente para pólos meióticos viáveis e assim escapando da eliminação (Camacho, 2005). Este processo foi verificado em vários organismos como em plantas da espécie *Lillium callosum* (Kayano, 1957), em insetos *Melanoplus femurrubrum* (Lucov & Nur, 1973; Nur, 1977) e *Eyprepocnemis plorans* (Zurita *et al.*, 1998; Bakkali *et al.*, 2002), entre outros.

Mecanismos de acumulação de cromossomos supranumerários podem ser observados também por não-disjunção na mitose pós-meioótica. Em plantas isso é influenciado pela maturação gametofásica e dessa forma as cromátides B irmãs vão para o núcleo gamético (Jones, 1995; Chiavarino *et al.*, 2000; Puertas, 2002). Outras plantas, como o milho, mostram esse mesmo mecanismo somente em machos (Carlson & Roseman, 1992), porém em alguns casos são transmitidos devido à fertilização de espermatozóides contendo cromossomos B (Romam, 1948).

Outro Mecanismo de acumulação foi sugerido recentemente por Pardo-Manuel de Villena & Sapienza (2001), e ocorreria devido ao maior número de cromossomos B com acúmulo de centrômeros durante a meiose em fêmeas. Este aumento seria favorecido em cariótipos preferencialmente acrocêntricos. Para testar esta hipótese, Palestis *et al.* (2004) analisaram 1.166 espécies de mamíferos, sendo 50 portadores de cromossomo B. Observaram que 61% das espécies com B tinham os cromossomos do complemento padrão predominantemente acrocêntrico. Do mesmo modo, Bidau & Martí (2004) também verificaram a presença de cromossomos B em populações com alta proporção de cromossomos acrocêntricos.

Segundo Camacho (1993), durante a prófase meiótica os cromossomos B podem emparelhar-se, com a formação de quiasmas, mas não apresentam emparelhamento com os demais cromossomos do cariótipo. Entretanto, Jones & Rees (1982) já haviam proposto que a frequência de formação de quiasmas tem sido muito considerada sob o ponto de vista adaptativo, pois poderia gerar genótipos novos e potencialmente superiores.

Além disso, existem diferentes B mostrando diversos mecanismos de transmissão, dirigidos ou não, sugerindo que os próprios cromossomos B poderiam ter mais mecanismos de acumulação, determinando sua transmissão e manutenção (Puertas, 2002).

1.2.8. Manutenção dos cromossomos B

Estudos envolvendo a distribuição e ainda a manutenção dos cromossomos B revelam informações interessantes. Write (1973) propôs dois modelos para justificar a manutenção desses cromossomos no cariótipo de populações naturais: o modelo parasítico e o modelo heterótico. No modelo parasítico, os cromossomos B conservam-se na população por seus próprios meios de acumulação. Sob esse ângulo, esses cromossomos são considerados egoístas ou parasitas, já que sua permanência na população não traz nenhum tipo de vantagem ao seu portador. O modelo heterótico propõe que os cromossomos se mantêm na população graças a algumas vantagens adaptativas que proporcionam aos seus portadores, quando em números reduzidos no cariótipo. A transição para a neutralidade ou “parasitismo” freqüentemente é acompanhada pela heterocromatinização dos elementos (Jones & Rees, 1982), podendo esta ser uma trajetória comum na evolução dos cromossomos B.

A sua acumulação subsequente em algumas populações é freqüentemente baseada em eventos simples envolvendo mecanismos de acumulação dirigidos que podem ocorrer antes, durante ou depois da meiose, para que esses cromossomos B possam se manter em populações naturais (Jones, 1991). Estes mecanismos de acumulação foram analisados, alternativamente, por Oliveira *et al.* (1997) e Cavallaro *et al.* (2000) e em ambos os trabalhos a direção para estes cromossomos B não foi verificada.

1.2.9. Estrutura e composição do cromossomo B

As análises da estrutura molecular dos cromossomos B mostram que eles estão sujeitos ao silenciamento gênico, ao acúmulo de DNA repetitivo e a heterocromatinização (Leach *et al.*, 2004). A maior parte dos cromossomos B são heterocromáticos devido à presença de cromatina

caracterizada por um alto nível de condensação durante o ciclo celular e essa compactação natural é resultante do alto conteúdo de DNA repetitivo de vários tipos, especialmente DNA satélites e DNA ribossomais (Camacho, 2005).

Entre os primeiros trabalhos realizados de análise do DNA de cromossomos B, Gibson & Hewitt (1972) utilizaram para a análise a técnica de ultracentrifugação de gradiente de densidade, e sugeriram uma associação entre a presença de cromossomo B com o DNA satélite em gafanhotos da espécie *M. maculatus*. Outros trabalhos utilizando esta mesma metodologia foram realizados posteriormente, porém este mesmo resultado não pode ser reproduzido em outros organismos (Chilton & MacCarthy, 1973; Dover & Henderson, 1975; Klein & Eckhardt, 1976). Anos mais tarde, Amos & Dover (1981), empregaram a digestão de endonucleases de restrição de DNA satélite previamente isolado por ultracentrifugação de gradiente de densidade de várias espécies de moscas do gênero *Glossina*. Neste mesmo trabalho foram realizadas hibridações em membrana (Southern) e *in situ* (ISH), produzindo sondas que não foram específicas para cromossomos B.

Nur *et al.* (1988) foi o primeiro a produzir uma sonda específica para cromossomo B, isolando alguns DNAs repetitivos específicos do sistema de determinação de sexo (PSR) presentes nos cromossomos B em abelhas da espécie *Nosonia vitripennis*, depois de testar 6.000 clones. O advento das técnicas de extração e amplificação por PCR (Polimerase Chain Reaction) do DNA a partir dos anos 90, além da aplicação da técnica de microdissecação, clonagem e da hibridação *in situ* fluorescente (FISH), proporcionou um grande impulso nos estudos dos cromossomos B de muitos organismos. McQuade *et al.* (1994) foi o primeiro a utilizar essas metodologias para isolar DNA dos cromossomos B de marsupiais da espécie *Petauroides volans*, produzindo uma sonda centromérica e outra específica para cromossomos B. Desde então estas técnicas foram empregadas em muitos outros animais e plantas portadores de cromossomos supranumerários, os quais revelaram que os cromossomos B são repletos de DNA repetitivos e em particular de elementos móveis (Camacho, 2005).

Cheng & Lin (2003) isolaram 19 seqüências de DNA repetitivos microdissecados de um cromossomo B de milho, das quais 18 apresentaram homologias com cromossomos do complemento A de regiões não codificantes e uma seqüência B-específica. Os cromossomos B também são fortes candidatos para conter genes de cópia simples, porém na maioria dos casos a evidência desses vem de uma associação entre a presença do cromossomo B e a observação de mudanças fenotípicas. Isto inclui genes que controlam a transmissão de cromossomos B em milho, pareamento meiótico em *Aegilops*, determinação sexual em sapos, esterilidade em machos da espécie *Plantago coronopus*, entre outros (Camacho, 2005).

Em anura, os cromossomos supranumerários variam em tamanho e número, além da quantidade de heterocromatina e de seqüências de DNA repetitivo, sendo que a maior parte dos cromossomos B parece ser derivado de cromossomos do complemento A de espécies correspondentes e aparentemente possuem seus próprios mecanismos de acumulação e mudanças evolutivas desde a sua formação (Schmid *et al.*, 2002 Green, 2004).

Entretanto, pouco se sabe sobre a estrutura dos cromossomos B de peixes até o momento, devido ao pequeno número de trabalhos desenvolvidos com esse intuito. Mestriner *et al.* (2000) foram os primeiros autores a descreverem parte da composição genética do DNA de um cromossomo B de peixes. Eles isolaram e caracterizaram uma seqüência de DNA satélite (As51) do cromossomo supranumerário de exemplares de *Astyanax scabripinnis* coletados em Campos do Jordão (SP). Esse satélite, rico em A-T, apresentou seqüências repetitivas de 51 pares de bases (pb) de comprimento que hibridaram nas regiões heterocromáticas não centroméricas, nas NORs e no cromossomo B dessa espécie. Esses dados, juntamente com resultados da análise do comportamento do complexo sinaptonêmico, reforçaram a hipótese de que o cromossomo supranumerário de *A. scabripinnis* seria um isocromossomo. A seqüência As51 apresentou homologia com um retrotransposon de *Anopheles gambiae* e com o transposon do *Bacillus thuringiensis*, sugerindo que essa seqüência pode ter se originado a partir de um elemento transponível de DNA. Os dados obtidos

por Jesus *et al.* (2003) suportam a hipótese que os B teriam se originado a partir dos autossomos que carregam o DNA satélite SATH1, identificadas no genoma de *Prochilodus lineatus* através da técnica de FISH, uma vez que essa seqüência está presente na região pericentromérica destes cromossomos e nos cromossomos supranumerários.

Uma seqüência específica isolada do cromossomo B através da técnica de AFLP (amplified fragment length polymorphism) e FISH é utilizada para caracterizar o cromossomo supranumerário do Ciprinídeo *Alburnus alburnus* (Ziegler *et al.*, 2003, Schmid *et al.*, 2006), não sendo detectada nos cromossomos do lote A dessa espécie e nos B de espécies relacionadas. Contudo, revelou forte homologia com o retrotransposon Gypsy/Ty3 de *Drosophila* e de *Oryzias latipes*, sugerindo que o cromossomo supranumerário não teria se originado do complemento padrão, mas teria evoluído independentemente.

Em alguns casos, blocos intersticiais de DNA telomérico têm sido observados tanto em macro e microcromossomos de *Nyctereustes procyonides* (Wurster-Hill *et al.*, 1988) e em B submetacêntrico de *Nectomys squamipes* (Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998) sugerindo que rearranjos envolvendo diferentes tipos de cromossomos poderiam proporcionar a origem desses cromossomos B. Um caso semelhante foi identificado em milho, onde foi encontrada seqüência de DNA B-específica contendo unidades repetitivas teloméricas (AGGGTTT), que são altamente conservadas em telômeros de plantas (Qi *et al.*, 2002).

1.2.10. Origem e evolução dos cromossomos B

Há grande polêmica quanto à origem e evolução desses cromossomos e as hipóteses até agora formuladas, apesar de estarem bastante relacionadas, geram pontos de vista conflitantes. Atualmente, considera-se que os cromossomos B de diferentes espécies possam ter origens distintas, desde combinações intra como interespecíficas. Contudo, apontar a origem do DNA progenitor desses cromossomos nem sempre é possível (Camacho *et al.*, 2000).

Em uma hipótese inicial, Write (1973) propôs que os cromossomos supranumerários seriam resultados de fragmentos heterocromáticos portadores de centrômero e sua evolução ter-se-ia dado por ocorrências sucessivas de rearranjos cromossômicos, levando finalmente à forma atual. Posteriormente, Volubujev (1981) propôs mais duas hipóteses para explicar a origem dos cromossomos supranumerários, onde os cromossomos B seriam sobras de rearranjos estruturais ocorridas na evolução do cariótipo ancestral ou ainda os cromossomos B seriam produto da não-disjunção de cromossomos autossomos ou de cromossomos sexuais, seguida de um processo de inativação genética.

Segundo Beukeboom (1994), os cromossomos B têm evolução paralela à dos cromossomos A, sofrendo algum tipo de alteração que os torna diferentes dentro do genoma de seus portadores. Essas alterações poderiam ser a causa da não homologia com os demais cromossomos do complemento. Outra trajetória para a evolução dos cromossomos supranumerários dentro do genoma seria a aquisição de características de cromossomo B através de modificações nos cromossomos sexuais (W ou Y), como tem sido postulado ocorrer em sapos da Nova Zelândia *Leiopelma hochstetteri* (Green *et al.*, 1993; Sharbel *et al.*, 1998) ou em pequenos animais, como em *Dicrostonyx groenlandicus* (Berend *et al.*, 2001).

Os resultados dos estudos citológicos e moleculares têm levado à formulação de diferentes hipóteses para explicar a origem dos cromossomos B. A hipótese mais aceita é a de que os B seriam um simples produto da evolução do cariótipo padrão. Nesse caso, eles poderiam se originar de cromossomos autossômicos polissômicos ou sexuais, de fragmentos cênicos resultantes de translocações Robertsonianas ou ainda da amplificação de regiões paracentroméricas de um cromossomo autossômico fragmentado, ou seja, os cromossomos B teriam sua origem identificada com modificações cariotípicas intra-específica (Camacho *et al.*, 2000). Os exemplos mais comuns desta proposta referem-se à quebra de cromossomos autossomos como parece ocorrer em algumas espécies de vegetais como em *crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1994, 1995), em *secale cereale* (Blunden *et al.*, 1993; Jones & Puertas, 1993; Cuadrado & Jouve,

1994; Wilkes *et al.*, 1995; Houben *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999) em *Zea mays* (Alfenito & Bilchler, 1993; Stark *et al.*, 1996) e em *Brachycome dichrosomatica* (Leach *et al.*, 1995; Donald *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996; Houben *et al.*, 1997a, 1999); em insetos da espécie *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht *et al.*, 1995); em Répteis *Dicoptodom tenebrosus* (Brinkman *et al.*, 2000); em algumas espécies de mamíferos como *Pteauroides volans* (McQuade *et al.*, 1994) *Reithrodontomys megalotis* (Peppers *et al.*, 1997) e em peixes *Astyanax scabripinnis* (Neo *et al.*, 2000), entre outros.

No que se diz respeito à origem dos cromossomos B a partir de cromossomos sexuais, deve-se salientar que pode acontecer tanto em sistemas em que há heteromorfismo entre os cromossomos sexuais quanto em sistemas onde a diferenciação não é expressa. Na prática, contudo, só foram registrados até o momento casos em que o cromossomo B se originou a partir de cromossomos em espécies que há heteromorfismo, provavelmente devido à dificuldade de se identificar cromossomos autossomos ligados ao sexo. Quando os cromossomos sexuais são heteromórficos, teoricamente os cromossomos B poderiam se originar tanto do cromossomo sexual que determina o sexo homogamético quanto do cromossomo sexual que determina o sexo heterogamético. Como, exemplos destes processos de origem dos cromossomos supranumerários a partir de cromossomos sexuais homogamético, podem-se citar os cromossomos B identificados no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* XX/XO (López-Leòn *et al.*, 1994) e de origem a partir de cromossomos sexuais heterogaméticos, em insetos Dípteros da espécie *Glossina spp.* (Amos & Dover, 1981) e em anfíbios da espécie *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel *et al.*, 1998).

Os cromossomos B poderiam ainda se originar por hibridação interespecífica, por transferência horizontal (elementos transponíveis), ou por mecanismos reprodutivos de eliminação cromossômica (Camacho *et al.*, 2000). Há na literatura alguns exemplos que apóiam estas hipóteses de origem, como em plantas do gênero *Coix* (Sapre & Desphande, 1987), em insetos Hymenoptera da espécie *Nosonia Vitripennis* (McAllister & Werren, 1997) em peixes da espécie *Poecilia formosa* (Shartl *et al.*, 1995). Mais recentemente, outra hipótese formulada para explicar a possível origem dos

cromossomos B, postula que estes seriam resultados de rearranjos em cromossomos decorrentes de cruzamentos entre espécies relacionadas, e que, a partir desta origem, seguiriam sua própria evolução (Vujosevic & Blagojevic, 2004). Com base nestas observações, pode-se supor que, através dos tempos, os cromossomos B estariam divergindo quantitativa e qualitativamente dos cromossomos do complexo A através da evolução das seqüências em decorrência de diferentes tipos de rearranjos (Ziegler *et al.*, 2003). Este postulado explicaria o fato dos cromossomos B, não estarem presentes em todos os indivíduos de uma mesma espécie ou população e poderem ser encontrados mais tardiamente em espécies pouco estudadas (Palestis *et al.*, 2004).

Numa hipótese alternativa, Foresti (1998), sugere que os cromossomos B poderiam ter sua origem em um processo denominado “de novo”, em tentativas da natureza de formar constantemente novas unidades genômicas. De acordo com o autor, seqüências de nucleotídeos formadas continuamente pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados, com a adição ao acaso de seqüências centroméricas e teloméricas, permitiriam a formação e manutenção dessas estruturas no genoma. Tais segmentos seriam neutros e sem produtos gênicos, até que elementos transponíveis ativos pudessem ser agregados. O trabalho de Langdon *et al.* (2000) em centeio da espécie *Secale cereale*, parece reforçar esta hipótese mostrando que os cromossomos B podem, ao se originar, estarem restritos a tecidos, ou a linhagens celulares. Por não estarem ligados à reprodução e, portanto não serem herdados, eles seriam gerados “de novo” a cada geração a partir do material genético celular. Poderiam até se tornar unidades independentes se envolvidos com as células da linhagem meiótica e assim tornarem-se possíveis de serem transmitidos para seus descendentes. Além disso, eles seriam heteromórficos e não se pareariam com os cromossomos do complemento padrão. Isso sugere a presença de mecanismos celulares, que poderiam causar rápida heterocromatinização dos elementos extras, como sugerido por Thomas (1995) construindo assim a base para diferenciação dos cromossomos B e, posteriormente, para sua evolução independente.

Recentemente, diferentes postulações têm sido formuladas para explicar a evolução independente dos cromossomos B no genoma de seus organismos portadores. Camacho *et al.* (2000) afirmam que, subseqüentemente ao isolamento sináptico do cromossomo B e independente de sua origem, também processos de evolução molecular, passaram a ocorrer, determinando uma morfologia degenerada para estes segmentos genômicos. Dessa forma as suas características morfológicas e estruturais seriam mais um reflexo destes processos de evolução molecular do que a forma em que foram originados. Nesse sentido, Araújo *et al.* (2001) apresentaram um dado interessante sobre a evolução dos cromossomos B. Mostraram que, na vespa *Tripoxylon albitarse*, os cromossomos B teriam regularizado seu comportamento meiótico e limitado seu número a um cromossomo por genoma haplóide, indicando que seria possível após anos de evolução independente, uma integração destes cromossomos ao complemento normal.

1.2.11. Efeito dos cromossomos B

Os dados acrescidos envolvendo a origem, manutenção e transmissão do cromossomo B ao longo desses anos, possibilitaram observar alguns efeitos desses nos indivíduos que os contêm, apesar de serem escassos os trabalhos envolvendo este tipo de abordagem.

Em vespas parasitóides da espécie *Nasonia vitripennis*, por exemplo, o cromossomo B presente pode interferir em muitos processos celulares e fisiológicos, não sendo, portanto, geneticamente inertes. Em algumas populações dessa espécie, existe um cromossomo B pequeno associado a um sistema de determinação de sexo haplo-diplóide que está restrito a alguns machos da população. Quando esses machos que apresentam cromossomo B fecundam as fêmeas, logo após a primeira divisão mitótica do zigoto, por um mecanismo ainda desconhecido, o cromossomo B provoca a condensação, fragmentação e eliminação do lote haplóide, restando então apenas o conjunto cromossômico materno e o próprio B, o que leva a eclosão de machos PSR (*Parental sex ratio*), pois o sistema de determinação de sexo é do tipo partenogênese arrenótoca. Assim,

a razão sexual que normalmente seria de 90% de fêmeas e 10% de machos, passa a ser de 90% de machos PSR, originados dos ovos nos quais o genoma paterno foi eliminado (apresentando o cromossomo B) e 10% machos normais, originados a partir dos 10% de ovos, que normalmente são fecundados nessa espécie (Werren, 1991; Perfectti & Werren, 2001).

López-Leòn *et al.* (1994) e Delgado *et al.* (1995) demonstraram que os cromossomos supranumerários interferem na atividade normal do DNA ribossômico. Foram verificadas pelos autores inativações de cístrons ribossomais em células de centeio, enquanto que no gafanhoto *Euprepocnemis plorans* foram identificadas mudanças no padrão das NORs (regiões organizadoras de nucléolo) quando constatada a presença desses cromossomos. Contudo, ainda não foram caracterizados em peixes, efeitos dos cromossomos B nos indivíduos que os carregam. Segundo Cavallaro *et al.* (2000) analisando populações de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu (SP) não foi evidenciada relações entre a presença de B com a indicação de uma condição corpórea. Este fato não dá suporte para influências dos cromossomos B em seus portadores e considera-se que seriam necessárias análises de outros componentes antes de concluir a realidade neste aspecto.

Segundo Volobujev (1981) os cromossomos B são totalmente heterocromáticos, ou, na sua maior parte compostos por heterocromatina, resultando em replicação tardia. Devido a esta característica são replicados no final ou na segunda metade da fase S da interfase, tendo como efeito um retardo do processo divisional das células. Apesar de alguns cromossomos B apresentarem aparentemente efeitos diretos e/ou indiretos no comportamento genético de seus portadores, muito mais pesquisas são necessárias para se aceitar como verdadeira a opinião geral que se tem hoje de que todos os cromossomos B apresentam genes ativos. Além disso, tais efeitos dos cromossomos B dependeriam das condições ambientais nas quais populações que os carregam se encontram e assim, esses efeitos poderiam apresentar também tanto variação temporal quanto espacial (Camacho *et al.*, 2000). Considera-se, pois que o verdadeiro papel dos cromossomos B dentro do genoma ainda está para ser esclarecido.

1.2.12. Perspectivas

As pesquisas relacionadas aos cromossomos B estão praticamente focadas em duas áreas de investigação, que abrangem sua organização molecular e sua transmissão e efeitos genotípicos (Camacho *et al.*, 2000; Puertas, 2002; Camacho *et al.*, 2004). No início dos estudos sobre cromossomos B imaginava-se que eles fossem muito semelhantes em suas seqüências e estrutura aos cromossomos do complexo A que provavelmente lhes davam origem. Deste modo, eles poderiam formar sinapses e recombinar com os mesmos. Entretanto, estudos mais recentes indicam que esses cromossomos, ao se originarem, modificam rapidamente sua estrutura em algumas gerações, impedindo a sinapse com seu possível “progenitor” de modo a seguir suas próprias vias evolutivas, isolando-se do resto do genoma (Camacho *et al.*, 2000).

Apesar da ampla diversidade e larga distribuição dos cromossomos B entre os organismos vivos, são poucas as informações existentes sobre a origem e papel desempenhado nos organismos que os carregam. Considerando que a maioria dos estudos dos cromossomos B em peixes é baseada em técnicas citogenéticas convencionais, análises moleculares adicionais serão necessárias para um melhor entendimento da composição, estrutura, origem e evolução desses elementos genômicos peculiares nesse grupo de organismos.

1.3. Estudos genéticos na espécie *Astyanax scabripinnis*

A espécie escolhida para o presente trabalho *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921), popularmente conhecida como lambari, apresenta a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Tetragonopterinae

Gênero: *Astyanax*

Espécie: *Astyanax scabripinnis*

Segundo Moreira-Filho & Bertollo (1991), esta espécie de peixe tem sido considerada componente de um complexo de espécies, por apresentar grande diversidade morfológica e cariotípica, denominado de “complexo *scabripinnis*”. Apresenta uma grande distribuição geográfica, sendo predominante na América do Sul (Fernandes & Martins-Santos, 2005). Trabalhos realizados com esta espécie por Mizoguchi & Martins-Santos (1998a), estudando quatro populações da bacia do rio Paraná e por Maistro *et al.* (1998a), analisando nove populações de *A. scabripinnis* provenientes de componentes das sub-bacias dos rios Paranapanema, Pardo e Tietê, permitiram caracterizar as diferentes populações através de análises citogenéticas e morfométricas, corroborando com a hipótese do “complexo *scabripinnis*”.

As razões para esta diversidade estão nas características morfológicas deste grupo de peixes. *Astyanax scabripinnis*, é uma espécie de água doce, podendo formar pequenas populações isoladas e com uma evolução particular independente, resultando assim em rearranjos cromossômicos distintos, que pode ser fixados em algumas populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Lowe-McConnell (1969) enfatizou que o tamanho absoluto de certos sistemas aquáticos é um importante fator no processo evolutivo dos peixes, desde que muitas espécies estejam envolvidas dentro do mesmo sistema, em sistemas isolados de rios tributários e lugares com barreiras interpopulacionais, de natureza física, química ou biótica. Considerando as características biológicas de *A. Scabripinnis*, associadas aos seus dados morfológicos, esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna neotropical.

Os primeiros estudos citogenéticos em exemplares de *A. scabripinnis* foram realizados por Moreira-Filho *et al.* (1978), numa população do ribeirão dos Bicudos (Brotas/SP), a qual apresentou um número diplóide igual a 50 cromossomos ($2n=50$). Em outro trabalho realizado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) seis das sete populações estudadas puderam claramente ser diferenciadas com base nos seus

caracteres cariotípicos e morfológicos. A partir desses resultados, muitos outros trabalhos foram desenvolvidos nesta espécie, abrangendo outras populações de diferentes bacias hidrográficas, reforçando a proposta que *A. scabripinnis* corresponde a um complexo de espécies. Esta proposta também é reforçada pelo fato de não serem encontrados híbridos entre espécimes com diferentes números diplóides vivendo em simpatria, tais como $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$, sendo este último o mais freqüente, bem como padrões de bandamento C específicos (Souza *et al.*, 1995b; Maistro *et al.*, 1998a; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Vieira, 2001; Centofante *et al.*, 2003).

Alguns indivíduos desta espécie têm mostrado também um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários, sendo que suas primeiras descrições começaram a ser realizadas no início dos anos 90. Salvador & Moreira-Filho (1992) analisando populações locais de Campos do Jordão (SP), encontraram $2n=50$ cromossomos e um grande cromossomo B metacêntrico, similar em tamanho e morfologia aos elementos do primeiro par cromossômico do cariótipo padrão, em aproximadamente 87% dos indivíduos analisados e constantemente encontrados em todas as células portadoras de B. Os autores verificaram ainda a ocorrência de 1-2 cromossomos B metacêntricos em exemplares de ambos os sexos. Porém, em uma fêmea, dois cromossomos B mostraram diferentes padrões de bandamento C, um totalmente corado e o outro parcialmente bandeado. No mesmo ano, um cromossomo B metacêntrico igualmente foi identificado em uma população de *A. scabripinnis* do córrego Cascatinha na região de Botucatu (SP) por Maistro *et al.* (1992), o qual foi encontrado ocorrerem somente em fêmeas nos indivíduos amostrados, sendo completamente heterocromático e com padrão de replicação tardio.

Macrocromossomos B restritos somente a células de fêmeas de *A. scabripinnis* foram encontrados em uma população do Córrego do Yukatan da bacia do Paraná por Mizoguchi & Martins-Santos, (1997), na qual também foi observada uma variação intraindividual de 0-2 microcromossomos B e ainda em uma população do rio Araquá, também da região de Botucatu (SP) por Maistro *et al.* (1994a). Entretanto, Outras

ocorrências de cromossomos B em *A. scabripinnis* foram características nos exemplares capturados no rio Jacu (ES), tendo sido evidenciados de 0-4 microcromossomos supranumerários restritos somente aos machos da espécie (Rocon-Stange & Almeida-Toledo, 1993). Microcromossomos B heterocromáticos foram encontrados da mesma forma em quatro populações de *A. scabripinnis* de diferentes regiões e bacias hidrográficas, apresentando de 1 a 4 cromossomos B restritos a machos (Rocon-Stange & Almeida-Toledo, 1993) ou a fêmeas (Mizoguchi & Martins Santos, 1997), dependendo da população.

Contudo, com relação à ocorrência dos cromossomos B em um dos dois sexos, estudos posteriores realizados por Porto-Foresti *et al.* (1997) evidenciaram a presença de cromossomos B em exemplares de ambos os sexos para a população do córrego Cascatinha na região de Botucatu (SP). Segundo Vicente *et al.* (1996) analisando três populações, na região de Campos do Jordão (SP) mostraram que os cromossomos B metacêntrico estão presentes em ambos os sexos, porém são mais freqüentes em fêmeas, além de todas populações apresentarem variações na freqüência dos cromossomos extras entre os sexos também apresentaram variações entre as populações, resultado este que foi corroborado anos mais tarde por Neo *et al.* (2000b) e Ferro *et al.* (2003).

Nesta espécie também foram encontrados outros tipos de polimorfismos. Diversos indivíduos apresentaram triploidias naturais com cromossomos B, como nos estudos de Fauaz *et al.* (1994) que observaram a ocorrência de dois cromossomos supranumerários em um exemplar de *A. scabripinnis* de Campos do Jordão que apresentava triploidia natural. Um caso similar foi notificado por Maistro *et al.* (1994b), que encontraram dois exemplares triplóides portadores de um e de dois macrocromossomos B nas amostras provenientes do rio Araquá e Córrego das Pedras, respectivamente.

Nos diversos estudos já realizados em *Astyanax scabripinnis* foram identificados diferentes tipos de cromossomos B, com base na morfologia e no padrão da heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1992; Maistro *et al.*, 1994a e b; Vicente, 1994; Vicente *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000a e b

Fernandes & Martins-Santos, 2005). Atualmente, a ocorrência de cromossomos B já foi descrita em 21 populações de *Astyanax scabripinnis*, de várias localidades e de diferentes bacias hidrográficas, sendo que o cromossomo B metacêntrico está presente em 17 populações e o microcromossomo B foi exclusivos das demais populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Por outro lado, outras formas variantes como o macrocromossomo B submetacêntrico, bem como o microcromossomo B, foram encontradas somente nas populações provenientes da região de Campos do Jordão (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Contudo, existem algumas populações em que ainda não foram encontrados os cromossomos B em nenhuma das formas descritas pelos autores acima citados.

As várias formas, tamanhos e frequências dos B encontradas possibilitaram supor combinações teoricamente esperadas nas populações de acordo com a altitude. Estudos realizados por Néo *et al.* (2000b) em três populações de *A. scabripinnis* capturadas em localidades de diferentes altitudes ao longo de um mesmo riacho, na região de Campos do Jordão (SP), revelaram a presença de diferentes cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920m e 1800m), assim como sua ausência na população de 700m. De acordo com os autores, o modelo encontrado seria melhor interpretado sob a luz da teoria parasítica de evolução de cromossomos B, segundo a qual esses elementos seriam mais frequentes em condições ambientais mais favoráveis para a espécie. Estudos realizados por Porto-Foresti *et al.* (1997), em investigação envolvendo a frequência de indivíduos portadores de cromossomos B e a densidade populacional desta espécie em três trechos consecutivos do córrego Cascatinha (Botucatu, SP), também identificaram um aumento na frequência de cromossomos B nas regiões mais elevadas deste curso de água.

Muitos relatos a respeito de cromossomo B foram feitos e muitas hipóteses sobre a origem e a manutenção desses cromossomos nas populações de *A. scabripinnis* foram levantadas. Salvador & Moreira-Filho (1992) e Maistro *et al.* (1992) consideraram a hipótese de que os cromossomos B encontrados nesta espécie seriam resultado de um evento de

não-disjunção de um dos elementos do primeiro par de um metacêntrico grande, seguido de um processo de heterocromatinização total ou parcial. Estudos gerais sobre a presença do grande B metacêntrico nesta espécie revelam sua natureza conservadora na forma, sendo que os cromossomos B comumente encontrados em *Astyanax scabripinnis*, apresentam morfologia semelhante em indivíduos de diferentes populações e bacias hidrográficas, sugerindo ser tal tipo de cromossomo B ancestral nesta espécie (Neo *et al.*, 2000a).

Outras evidências sugerem que o cromossomo B metacêntrico corresponde a um isocromossomo, proposto inicialmente por Dias (1994) e posteriormente por Jesus & Moreira-Filho (2000a e b). Neo *et al.* (2000a) propuseram que o macrocromossomo B metacêntrico, bem como o microcromossomo, teriam se originado simultaneamente como isocromossomos, a partir de um cromossomo subtelo/acrocêntrico presente no complemento padrão e que os demais tipos de cromossomos B encontrados representariam formas derivadas do grande metacêntrico B. Na análise de indivíduos de uma população específica a hipótese proposta por Vicente *et al.* (1996) aponta para o fato de que o cromossomo B provavelmente teria derivado do cromossomo acrocêntrico do par número 24 do complemento cariotípico (A).

Os dados de Mestriner *et al.* (2000) parecem reforçar esta hipótese, demonstrando que a estrutura do cromossomo B metacêntrico identificaria sua morfologia como característica de um isocromossomo. Usando hibridação *in situ* fluorescente, estes autores demonstraram que um DNA repetitivo, com aproximadamente 51 pb e 59% rica em AT (As51) obtido pela digestão do DNA genômico com *KpnI*, estava particularmente localizada na região terminal de alguns cromossomos acrocêntricos, na região da NOR e da heterocromatina intersticial do cromossomo 24. Mais significativa, a repetição em *tandem* desse DNA quase simetricamente nos dois braços do cromossomo B metacêntrico, seriam indicativa da homologia estrutural entre eles. Porém, esta hipótese não foi suportada pelos dados de bandeamentos cromossômicos obtidos por Maistro *et al.* (2001), Ferro *et al.* (2001) e Ferro *et al.* (2003), em indivíduos de outras populações.

Moreira-Filho *et al.* (2001) propõe outra hipótese, fundamentada na similaridade do cromossomo B entre as diferentes espécies do gênero *Astyanax*, como em *Astyanax eigenmanniorum* (Stripecke *et al.*, 1985) *Astyanax fasciatus* e *Astyanax schubarti* (Moreira-Filho *et al.*, 2001; Pazza *et al.*, 2006) e entre as diferentes populações de *A. scabripinnis* (Moreira-Filho *et al.*, 2004), sugerindo a sua origem precede a diferenciação das espécies. Contudo, análises moleculares para estes B seriam necessários para testar e validar esta hipótese.

Embora já existam inúmeros estudos com vários tipos de abordagens em diversos grupos de organismos, com a finalidade de se entender a origem e possíveis funções dos enigmáticos cromossomos B, existem ainda muitas perguntas sem respostas. Desta forma, as pesquisas que foram realizadas neste trabalho em relação a esses cromossomos têm a finalidade de buscar esclarecimentos sobre sua estrutura e uma melhor compreensão dos processos que fizeram com que esses cromossomos se fixassem nas populações e da sua verdadeira função buscando desvendar o verdadeiro papel desses cromossomos B no genoma dessa espécie.

1.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD (Randomly amplified polymorphic DNAs)

A introdução da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), desenvolvida por Kary Mullis em 1984 e a utilização de metodologias envolvendo o uso de RAPD, entre outras, possibilitaria identificação de uma vasta gama de marcadores do genoma nuclear (Stepien & Kocher, 1997). Tais marcadores têm sido extensivamente utilizados por apresentarem atributos que os tornam favoráveis para estudos de conservação e diversidade genética, por serem abundantes e apresentarem altos níveis de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A técnica de RAPD foi descrita primeiramente por Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990) independentemente e se caracteriza por utilizar quantidades mínimas de DNA genômico para análises genotípicas e não requerer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para cada organismo de interesse. Outra grande vantagem dessa

metodologia é a utilização de *primers* com seqüências curtas de oligonucleotídeos, de aproximadamente 10pb (pares de bases). A identificação de polimorfismos do DNA, através da amplificação aleatória de múltiplas regiões do genoma, é realizada utilizando um único *primer*, com a finalidade de quantificar a variabilidade genética dentro e entre populações e estimar a similaridade genética entre as espécies. Devido à sua simplicidade e rapidez, tornou-se uma metodologia amplamente empregada em diferentes organismos, já existindo diversos trabalhos em peixes relacionados à identificação de espécies (Dinesh *et al.*, 1993; Bardacki & Skibinski, 1994; Borowsky *et al.*, 1995; Sultmann *et al.*, 1995; Partis & Wells 1996, Prioli *et al.*, 2002); de subespécies (Bardacki & Skibinski, 1994); de híbridos (Elo *et al.*, 1997); à análise de polimorfismos (Johnson *et al.*, 1994; Caccone *et al.*, 1997; Dergan *et al.*, 1998; Nadig *et al.*, 1998; Kuusipalo, 1999; Cagigas *et al.*, 1999); à detecção da variabilidade genética em populações naturais e cultivadas (Crossland *et al.*, 1993; Bardacki & Skibinski 1994; Bielawski & Pumo 1997; Koh *et al.*, 1999; Nesbo, *et al.*, 1999; Wasko *et al.*, 2002, Revaldaves *et al.*, 2001, Corazza-Bassetto, submetido à publicação); à identificação de indivíduos ginogenéticos (Chen & Leibenguth 1995; Eenennaam *et al.*, 1996); ao mapeamento gênico (Postlewait *et al.*, 1994; Kazianis *et al.*, 1996; Lin & Chou, 1997; Liu *et al.*, 1999); caracterização de segmentos cromossômicos (King *et al.*, 1993) e a análises filogenéticas (Sultmann *et al.* 1995; Dergan *et al.*, 2002, Corazza-Bassetto submetido à publicação), entre outros.

Williams *et al.* (1990) afirmam que o uso de marcadores em diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, mapeamentos genéticos, e estudos evolutivos são de grande importância. Apesar da potencialidade da técnica de RAPD e mesmo outras que utilizem a técnica de PCR, são poucos ainda os trabalhos envolvendo este tipo de marcador molecular em cromossomos supranumerários.

Gourmet & Rayburn (1996) trabalhando com milho da espécie *Zea mays*, foram os primeiros a encontrarem associações entre marcadores moleculares do tipo RAPD e cromossomos B em uma análise populacional utilizando quatro *primers*, o que os permitiram concluir que marcadores RAPD

são úteis para se conduzir vários tipos de pesquisa com cromossomos B, como mapeamento, origem e evolução dos mesmos. Tosta *et al.* (1998) também descobriram um marcador RAPD associado a cromossomo B em abelhas operárias da espécie *Partamona helleri*.

Além desses, outros dados como os obtidos por Levin *et al.* (1993) em galinhas, Stein *et al.* (2001) em salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) e Kovács *et al.* (2001) em catfish (*Clarias gariepinus*), entre outros, identificaram seqüências específicas de cromossomos sexuais por meio do RAPD. Assim também os trabalhos de Tanic *et al.* (2000), Qi *et al.* (2002), Ziegler *et al.* (2003) e Schmid *et al.* (2006), mostram que outras técnicas com base em PCR como AP-PCR, AFLP, entre outras, podem ser usadas para detecção de seqüências específicas dos cromossomos B. Considera-se, pois, que ainda esta técnica poderá fornecer dados importantes sobre a origem e evolução dos cromossomos B.

1.5. Microdissecação cromossômica

O advento da tecnologia da genética molecular possibilitou um aumento significativo do conhecimento da estrutura e do comportamento dos cromossomos durante a mitose e a meiose, assim como a descrição das alterações cromossômicas não identificadas através das análises cromossômicas convencionais. Neste sentido a técnica de microdissecação cromossômica é um procedimento confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo estabelecimento de sondas para FISH, construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e o mapeamento físico para análise citogenética.

A técnica de microdissecação foi introduzida inicialmente em citogenética humana (Bates *et al.*, 1986), com a construção de uma biblioteca do cromossomo 2 usando-se muitos fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke *et al.* (1989) publicaram um procedimento de microdissecação no qual foi utilizada a técnica de PCR para amplificar as pequenas quantidades de DNA dos fragmentos cromossômicos dissecados. Esse método foi

aperfeiçoado por Senger *et al.* (1990) que dissecaram com sucesso bandas específicas de cromossomos bandeados com a técnica GTG. E, finalmente, Meltzer *et al.* (1992) e Deng *et al.* (1992) desenvolveram a técnica de microFISH, na qual a microdissecação cromossômica é seguida pela amplificação do material dissecado via PCR, utilizando-se um *primer* degenerado (DOP - *Degenerated Oligonucleotide Primer*). O produto do PCR é então utilizado como sonda para FISH.

A técnica de microFISH permite a localização cromossômica de seqüências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros (Trask, 1991; Houben *et al.*, 2001). Em humanos, esta técnica, aliada às metodologias de citogenética clássica, tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica na caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer *et al.*, 1997; Wiltshire *et al.*, 2001; Nuntakarn *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; entre outros). No contexto da evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Taguchi *et al.*, 2003; Nieves *et al.*, 2005; Neusser *et al.*, 2005), cervídeos (Li *et al.*, 2005), roedores (Fagundes *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2004), entre outros.

A pintura cromossômica, amplamente utilizada nos mamíferos, representa uma tecnologia muito promissora a ser empregada no estudo de homologias cromossômicas em peixes, devido às dificuldades encontradas para obtenção de bandas longitudinais estruturais nos cromossomos desse grupo de organismos (Galetti Jr. & Martins, 2004). Embora a microdissecação esteja sendo aplicada com sucesso nos peixes, os poucos trabalhos se concentram no estudo dos cromossomos sexuais. Reed *et al.* (1995) produziram uma sonda derivada do braço menor do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*. Esta sonda hibridou nos cromossomos X e Y dessa espécie e no maior par de cromossomos SM (provavelmente o par sexual) de duas outras espécies de salmonídeos, indicando que esses pares cromossômicos são homeólogos. Harvey *et al.* (2002) usaram esta técnica para produzir sondas específicas dos prováveis cromossomos sexuais, o maior par do complemento, de *Oreochromis niloticus*. Os resultados obtidos

forneceram evidências da existência de diferenças entre as seqüências dos cromossomos sexuais, suportando a teoria de que o primeiro par cromossômico está relacionado com a determinação sexual e que os cromossomos sexuais estão num grau inicial de divergência. Stein *et al.* (2002) isolaram um locus de microssatélite ligado ao sexo do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*. Assim como nos estudos anteriores em outras espécies de peixes, o locus sexual localizou-se próximo ao telômero.

A microdissecação cromossômica fornece um método direto de análise da composição molecular dos cromossomos B. As informações obtidas dessas análises são de grande interesse para o entendimento da possível função desses cromossomos no genoma (McQuade *et al.*, 1994). A técnica de microdissecação tem sido utilizada no estudo dos cromossomos B em vários grupos de animais como sapos (Sharbel *et al.*, 1998), salamandras (Brinkman *et al.*, 2000), roedores (Karamysheva *et al.*, 2002; Trifonov *et al.*, 2002; Rubtsov *et al.*, 2004) e marsupiais (McQuade *et al.*, 1994). Entretanto, não há nenhum trabalho em peixes descrito na literatura até o momento. Dessa forma, a utilização da metodologia de micro-FISH na caracterização dos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* será uma ferramenta valiosa na obtenção de dados para uma melhor compreensão da composição, estrutura e mecanismos envolvidos na origem e evolução desse tipo de cromossomos nessa espécie e, de uma forma geral, em peixes.

1.6. Seqüências Repetitivas de DNA

Uma grande porção do genoma dos eucariotos consiste de seqüências repetitivas, as quais podem ser dispersas ou organizadas em *tandem* (Charlesworth *et al.*, 1994). Quando organizadas em *tandem*, o DNA repetitivo é conhecido como DNA satélite e está normalmente localizado em regiões de heterocromatina detectada por bandeamento C (Brutlang, 1980 e Sumner, 1990). Em peixes os DNAs satélites estão localizados geralmente em regiões heterocromáticas centroméricas e pericentroméricas (Haaf *et al.*, 1993; Oliveira & Wright, 1998; Phillips & Reed, 2000; Jesus *et al.*, 2003). Estas seqüências podem estar envolvidas em diferentes tipos de mutações que causam desde variações no tamanho dos genomas até substituições,

deleções e inserções de um único nucleotídeo. Podem estar envolvidas também em diferentes rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas. Elas são, sem dúvida, responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas entre muitos grupos de organismos (Kidwell, 2002).

Ainda não se sabe ao certo qual a função das seqüências repetitivas, as quais foram consideradas por muitos anos como DNA egoísta (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980) ou como DNA “lixo” (Nowak, 1994), não sendo responsáveis por nenhuma contribuição biológica para seus portadores. Por outro lado, alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento destas seqüências em algumas doenças (Kazazian *et al.*, 1988), na regulação e reparo de alguns genes (Messier *et al.*, 1996), assim como na diferenciação de cromossomos sexuais (Anleitner & Haymer, 1992; Kraemer & Schmidt, 1993). Recentemente foi demonstrado que tais seqüências podem ser extremamente importantes na organização estrutural, funcional e na variação do tamanho dos genomas (Schueler *et al.*, 2001; Shapiro, 2005; Shapiro & Sternberg, 2005; Martins, 2005; Martins *et al.*, 2006).

Os DNAs repetitivos incluem seqüências organizadas em cadeia como as seqüências satélites, minissatélites e microssatélites e as seqüências dispersas como transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994). DNAs satélites são seqüências altamente repetitivas, geralmente com cerca de 100 a 300 pb de comprimento. Essas seqüências podem repetir 2 a 5 cópias (microssatélites), de 10 a 60 cópias (minissatélites) ou mais de 100.000 cópias de uma única seqüência básica (satélites), que ocorrem em um ou mais locos ao longo dos cromossomos. Essas seqüências encontram-se localizadas principalmente nas regiões teloméricas e centroméricas dos cromossomos e são os principais componentes da heterocromatina (Martins, 2005).

A heterocromatina é encontrada em centrômeros, telômeros e em posições intersticiais ao longo dos braços cromossômicos e o papel mais significativo das seqüências repetitivas pode ser ilustrados pelos segmentos repetitivos presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, que desempenham funções cruciais na manutenção e

propagação do material genético nuclear, devido a várias proteínas que se ligam nestas seqüências repetitivas (Csink & Henikoff, 1998). A eucromatina rica em genes também pode conter algumas seqüências repetitivas; no entanto, estas parecem causar mutações prejudiciais aos genes e seriam eliminadas pela pressão seletiva (Deininger *et al.*, 2003).

Diferentes estudos têm demonstrado que as seqüências repetitivas não estão distribuídas ao acaso no genoma de muitos organismos. Estas seqüências geralmente estão localizadas fora de regiões ricas em genes, tais como regiões intergênicas, heterocromáticas e em alguns casos envolvendo elementos transponíveis do tipo disperso (Charlesworth *et al.*, 1994; Kidwell, 2002; Ficher *et al.*, 2004).

As análises das seqüências repetitivas entre todos os genomas seqüenciados permanecem como grandes *gaps* por causa da dificuldade em determinar sua correta posição e números de cópias, pelo fato de certas técnicas moleculares serem incapazes de identificar, ordenar e esclarecer o arranjo dos diferentes segmentos de seqüências repetitivas no genoma (Schwarzacher, 2003). Assim, a integração dos dados de seqüenciamento e mapeamento cromossômico podem promover um incremento no conhecimento dos elementos repetitivos, proporcionando novas informações envolvendo rearranjos cromossômicos, cromossomos sexuais e ou supranumerários, além de serem utilizados como marcadores cromossômicos.



Objetivos

2. Objetivos

Embora já existam estudos identificando características estruturais e moleculares relacionadas aos cromossomos B em peixes, estes dados ainda são pouco expressivos, principalmente levando-se em consideração a grande diversidade de espécies deste grupo de vertebrados. Portanto, o objetivo desse estudo é ampliar os estudos das características dos macrocromossomos B de *Astyanax scabripinnis* com o uso de técnicas citogenéticas e moleculares, buscando informações para uma melhor compreensão sobre a estrutura e constituição destes segmentos genômicos e dos mecanismos envolvidos na sua origem e evolução nesta espécie. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- ❖ Obter preparações de cromossomos mitóticos, em *Astyanax scabripinnis* para a caracterização e seleção dos indivíduos portadores de cromossomos B nas populações estudadas neste trabalho;

- ❖ Aplicar metodologia de microdissecação dos macrocromossomos B metacêntricos de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cascatinha, para obter sondas específicas desses cromossomos supranumerários;

- ❖ Localizar essas sondas específicas nos cromossomos metafásicos de indivíduos desta mesma população, com e sem cromossomos B, buscando identificar regiões associadas nos cromossomos B e nos cromossomos do complemento padrão;

- ❖ Obter bandas específicas para portadores de cromossomo B por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”);

- ❖ Isolar os fragmentos de DNA obtidos e localizar sua posição de associação em cromossomos mitóticos de *Astyanax scabripinnis* de diferentes populações; utilizando a técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), para melhor caracterização de segmentos específicos no genoma dessa espécie;

- ❖ Realizar adaptação do protocolo de técnica para isolamento de seqüências repetitivas através de autoclavagem do DNA genômico, com a finalidade de auxiliar os estudos genéticos da espécie;

- ❖ Verificar a possível ocorrência dessas seqüências repetitivas na composição genética dos cromossomos B das populações estudadas, procurando contribuir para a compreensão dos processos relacionados à origem destes segmentos genômicos.



Material e Métodos

3. MATERIAL

3.1. Populações estudadas e locais de coletas

No presente trabalho foram obtidos exemplares de *Astyanax scabripinnis* (Figura 1) de duas populações que apresentam cromossomos supranumerários em seu complemento cromossômico (Maistro *et al.*, 1994a; Porto-Foresti *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 1998a; Maistro *et al.*, 2001; Vieira, 2001).

Os indivíduos foram coletados no córrego Cascatinha (Botucatu-SP), componente da bacia hidrográfica do rio Tietê (Figuras 2 e 3), onde apresentaram $2n=50$ cromossomos e em alguns indivíduos $2n=51$, devido à presença de um macrocromossomo supranumerário e no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP) componente da bacia hidrográfica do rio Pardo (afluente do rio Paranapanema) (Figuras 2 e 4), apresentaram $2n=46$ e em alguns indivíduos $2n=47$, também pela ocorrência de um macrocromossomo supranumerário. Os animais capturados foram trazidos para o laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, em Botucatu, SP e mantidos em aquários aerados para posterior obtenção de preparações cromossômicas e coleta de tecidos para extração de DNA.

O processamento do material e a análise citogenética e molecular foram realizados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, IB, UNESP (Universidade Estadual Paulista), em Botucatu, SP. Os exemplares utilizados na amostragem foram identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório.

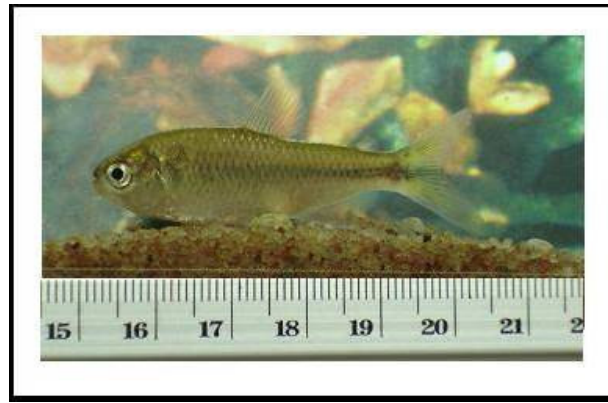


Figura 1: Exemplar de *Astyanax scabripinnis* coletado no Córrego Cascatinha (Botucatu-SP).

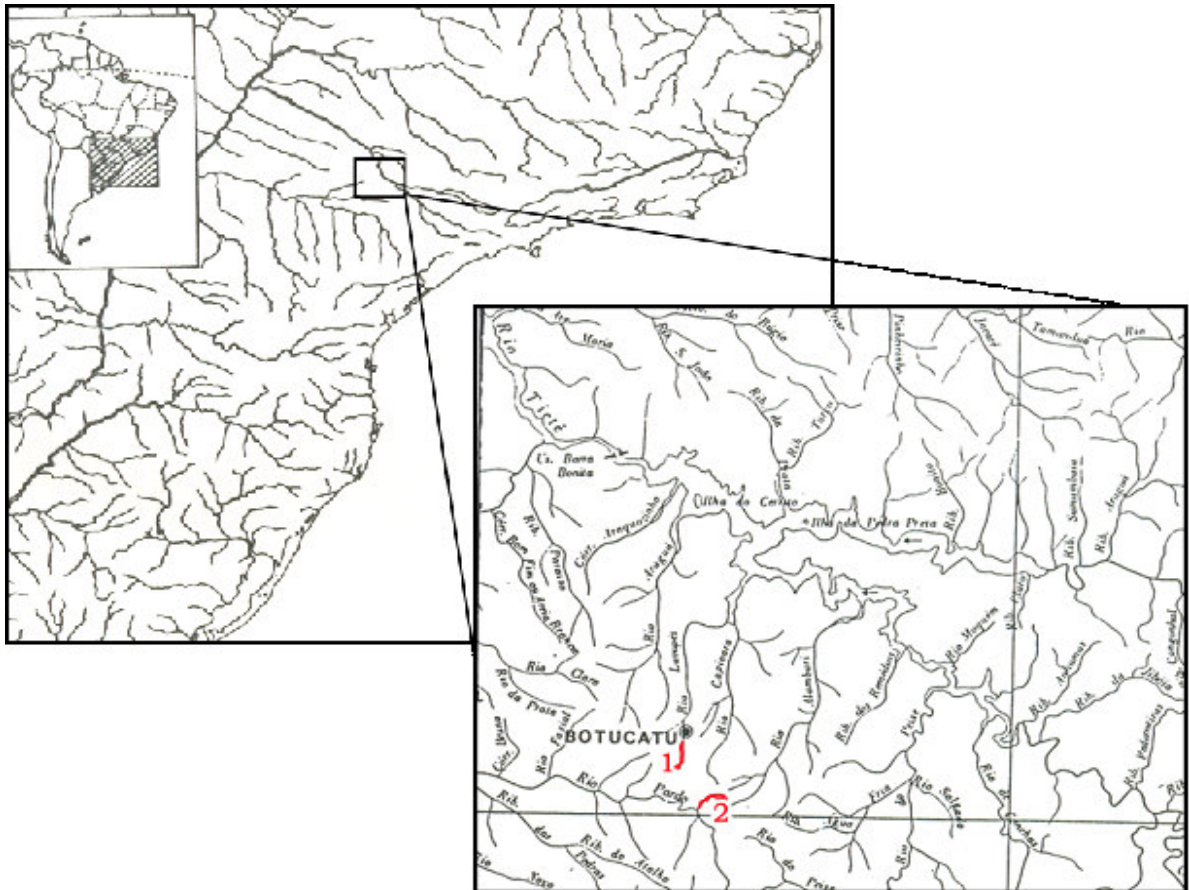


Figura 2: Mapa da região do município de Botucatu. Os números indicam os locais de coleta da espécie *Astyanax scabripinnis*. **1)** córrego Cascatinha componente da bacia hidrográfica do rio Tietê. **2)** Ribeirão Água da Madalena componente da bacia hidrográfica do rio Pardo (afluente do rio Parapanema).



Figura 3. Local de coleta no córrego Cascatinha, região de Botucatu-SP.



Figura 4. Local de coleta no Ribeirão Água da Madalena, região de Botucatu-SP.

4. MÉTODOS

4.1. Preparação Cromossômica

4.1.1. Estimulação de mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada a técnica descrita por Oliveira *et al.* (1988), que consiste inicialmente em preparar uma solução de fermento biológico (0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada) e incubá-la por cerca de 20min a 40°C. Após este tempo, a solução é injetada na proporção de 1ml /100g peso do animal na região dorso-lateral do corpo do animal, que é colocado em aquário bem aerado de 48 a 72 horas.

4.1.2. Preparação de cromossomos mitóticos

A análise citogenética foi realizada em células extraídas do rim, seguindo a metodologia descrita por Foresti *et al.* (1993), que consiste em injetar colchicina (0,025%) na proporção de 0,5ml para cada 100g de peso do animal e deixá-lo em aquário por 50min; sacrificar o animal retirando o rim; colocar o tecido retirado em uma placa de Petri contendo 7ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M). Dissociar o material com pinças de pontas finas e depois homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur; colocar a suspensão um tubo de centrifuga, deixando-o no interior de estufa a 37°C por 21min. Pré-fixar com 5 gotas de fixador (metanol/ácido acético 3:1) por 5 min. O material é então fixado com a adição de 7ml de metanol/ácido acético (3:1) e homogeneizado com pipeta Pasteur e levado à centrifuga (900 a 100rpm) por 10min. O sobrenadante é retirado e o material celular ressuspenso com fixador com pipeta Pasteur (repetir mais duas vezes). O material é gotejado em lâminas e deixado secar ao ar. Procedese então a coloração com solução de Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH=6,7) por 10min. Lavando-se com água e colocando-se a lâmina para secar. Faz-se então a verificação da qualidade do material ao microscópio e o registro dos indivíduos com cromossomo supranumerário ou não e nas outras lâminas foi aplicada a técnica de bandeamento C, descrita no tópico 4.1.3. O restante do material foi eluído em metanol e guardado em Eppendorf de 1,5ml a -4°C

para posterior aplicação das técnicas de microdissecção e hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

4.1.3. Bandamento C

Para obtenção de bandas C utilizou-se a técnica descrita originalmente por Sumner (1972), com algumas modificações, que consiste em hidrolisar as lâminas por 30min em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada. Passar por uma solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) por 1min a 60°C e lavar em água destilada. Em seguida, lavar em HCl 1N a 60°C e lavar novamente em água destilada. Foi incubado por 30min em 2xSSC (pH = 6,8), a 60°C. Corar por aproximadamente 30min com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (pH = 6,7).

4.2. Microdissecção Cromossômica

4.2.1. Agulhas ou Micropipetas

Para microdissecar os cromossomos, foram utilizadas agulhas produzidas a partir de capilares de vidro com diâmetros de aproximadamente 0,5mm em puller (Narishige PC-10), cedidas gentilmente pelo Prof. Alejandro Laudicina (Laboratorio de Citogenética Molecular, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires-Argentina) e outras do tipo Fentotip e Fentotip II (cedidas pela Eppendorf), com diâmetros de 0,5mm e de 0,2mm, respectivamente.

4.2.2. Microdissecção

O procedimento de microdissecção foi realizado com base na metodologia de Hu *et al.* (1998), com modificações no protocolo inicial para sua adaptação ao organismo de interesse desse trabalho. Os cromossomos supranumerários de *Astyanax scabripinnis* foram “raspados” de lamínulas preparadas minutos antes da Microdissecção, nas quais foi pingada apenas uma gota do material em suspensão no centro de cada lamínula e coradas normalmente com Giemsa, por 10min. Para proceder à raspagem, foram utilizadas microagulhas fixadas no micromanipulador eletrônico (Joystick,

TransferMan NK2, Eppendorf) acoplado a um microscópio AXIOvert 100 (Zeiss).

Os 25 macrocromossomos B microdissecados foram colocados em oito tubos de Eppendorf 0,2ml, contendo 20 μ l de proteinase K (19ng/ μ l) cada (variando de 2 a 5 cromossomos em cada tubo). Estes foram tratados em seguida a 37°C por 2 horas (Zhang *et al.*, 2005). A primeira amplificação foi realizada utilizando-se o kit *GenomiPhi*TM (Amersham Biosciences) seguindo a especificação do fabricante. Para cada 1 μ l de DNA microdissecado, acrescenta-se 9 μ l de buffer. Aquecer 95°C por 3min e colocar no gelo a 4°C. A seguir, deve-se adicionar 1 μ l do mix de enzima e foi incubado a amostra a 30°C por 16-18 horas. A Inativação da reação foi realizada incubando-se a 65°C por 10min e resfriando-se a 4°C.

4.2.3. SCOMP (single cell comparative genomic hybridization)

Depois da amplificação utilizando o kit *GenomiPhi*TM, foi realizada uma segunda amplificação e a marcação por SCOMP, técnica desenvolvida por Stoecklein *et al.* (2002). Nas reações de clivagem com endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e a primeira amplificação pela PCR foram realizadas no mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos. As etapas foram descritas abaixo com algumas modificações

Digestão: Inicialmente, o DNA foi submetido à clivagem com 24U da endonuclease de restrição *MseI* (*New England BioLabs*), em tampão universal *One-phor-all buffer plus* (OPA plus) (10mM de Tris-acetato pH7.5, 10mM de acetato de magnésio, 50mM de acetato de potácio).

Digestão com *MseI* (tubo A) **no gelo

MseI digest solution (Total 2,0 μ l)

0,2 μ l Tampão OPA plus

0,2 μ l *MseI* (50.000U)

1,6 μ l H₂O

Foi misturado 2,0 μ l de *MseI digest solution* no tubo contendo 3,0 μ l de DNA do cromossomo microdissecado e foi incubado à 37°C por 3 horas e em seguida à 65°C por 5min, para inativar a enzima.

Formação de adaptador:# *Adaptador* (Total 3,0µl) (Tubo B)0,5µl tampão *One-phor-all*

0,5µl Oligo LIB1 100µM

0,5µl Oligo dd MSE 100µM

1,5µl H₂O

Em um tubo separado, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonucleotídeos LIB1 (5'-AGTGGGATTCCTGCTGCTAGT-3') e ddMseI (5'-TAACTGACAGCdd-3'). O pareamento de bases dos oligonucleotídeos adaptadores foi realizado num tubo separado por gradiente de temperatura de 65°C a 15°C, com rampa de 1°C/min.

Ligação: Em seguida, adicionou-se 1µl de dATP 10mM de T4 DNA ligase 5U/µl ao tubo B. Esta mistura (Tubo B) foi transferida ao DNA tratado com a endonuclease *MseI* (Tubo A) e incubada a 15°C *overnight* (16hrs).

Amplificação Primária:# *Mix* (Total 41µl)3µl *Expand-long-template buffer* (Roche)

2µl dNTP mix 10mM (2,5nM cada)

1µl *Expand-long-template pol mix* 3,5U/µl35µl H₂O

Foi adicionado 40µl do *Mix* à reação de ligação (Tubo A), que foi realizada em um termociclador programável PTC 200 (*MJ Research*), que consistiu em:

1 ciclo	{	68°C por 3 min
15 ciclos	{	94°C por 40seg
		57°C por 30seg
		68°C por 1min e 30seg com 1seg adicional/ciclo
8 ciclos	{	94°C por 40seg
		57°C por 30seg com 1°C adicional/ciclo
		68°C por 1 min e 45seg com 1seg adicional/ciclo
22 ciclos	{	94°C por 40seg
		65°C por 30seg
		68°C por 1min e 53seg com 1seg adicional/ciclo
1 ciclo	{	68°C por 3min e 40seg

8°C ∞

O material amplificado foi checado em gel de Agarose 1%, para proceder à próxima etapa.

Marcação ou Amplificação Secundária:

Marcação (Total 41,15µl)

4µl *Expand-long-template buffer*

6µl *primer* LIB1 10µM

1,4µl dNTP mix (10mM de cada dGTP, dATP, dCTP e 8,5mM de dTTP)

1,75µl Biotina 16 dUTP ou Digoxigenina 11dUTP

2µl "*pool*" Mix 5U/µl

26µl H₂O

Foi misturado: 2µl do produto da PCR primária (DNA do cromossomo microdissecado) com 40µl do produto da amplificação secundária (Biotina ou Digoxigenina). Utilizou-se dois tubos para obtenção de duas sondas diferentes, sendo uma marcada com Biotina (verde) e outra marcada com Digoxigenina (vermelho). Para ambos os tubos a amplificação foi realizada em um termociclador programável PTC 200 (*MJ Research*), que consistiu de:

1 ciclo	{	94°C por 1 min
		60°C por 30seg
		72°C por 2min
10 ciclos	{	94°C por 30seg
		60°C por 30seg
		72°C por 2min com 20seg adicional/ciclo

Remoção do *primer* LIB1

Reação (Total 43µl)

40µl desta ultima reação de PCR (Sonda)

2µl *Buffer R*

1µl Tru I (*isoschizomere of MseI*)

Foi incubado por 3 horas à 65°C, checado em gel de Agarose 1% e estocado em freezer (-20°C). A precipitação da sonda só foi realizada no dia da hibridação.

Precipitação da Sonda:

(Total 410µl)

10µl acetato de sódio 3M

10µl EDTA

400µl etanol absoluto gelado

O tubo foi mantido a -20°C *overnight* (pode ser mantido a -70 por 1 hora), foi centrifugado a 14.000rpm, 4°C por 45min e o sobrenadante desprezado. Foi adicionado 300µl de etanol 70% gelado, centrifugado por 20min à 4°C a 14.000rpm e o sobrenadante desprezado. A sonda seca, foi ressuspendida em 30µl de Hibridisol VII, desnaturada em banho-maria a 75°C por 10min e incubada a 37°C por no mínimo uma hora.

Preparação da Lâmina: As lâminas foram desidratadas em uma primeira série alcoólica (70, 90 e 100%), por 5min cada e secadas a temperatura ambiente. Em seguida, foram tratadas com Pepsina (10% pepsina + solução de HCl 0,01N) por 10min aquecida a 37°C, transferidas para solução de tampão 1XPBS/MgCl₂ 50mM por a 37°C por 10min e Tratadas com 2XSSC por 10min aquecida à 37°C. Foi então realizado uma segunda série alcoólica (70, 90 e 100%), por 5min cada (neste momento o tratamento pode ser interrompido e as Lâminas guardadas em freezer -20°C). As lâminas foram desnaturadas em Formamida 70%/2XSSC a 72°C, tendo uma variação no tempo de desnaturação de 20seg a 1min de uma lâmina a outra. Em seguida foi novamente desidratada mas em uma série alcoólica gelada (70, 90 e 100%), por 3min cada.

Hibridação: Foi colocado 15µl de sonda sobre a lamínula e a lâmina tratada invertida sobre a mesma (para que o material disposto na lâmina entre em contato com a sonda sem formação de bolhas). Para não ressecar o material, a lamínula foi selada com *rubber cement*. As lâminas foram mantidas em câmara úmida (2xSSC) a 37°C por 72 horas. Realizou-se o mesmo procedimento com a sonda marcada com Digoxigenina.

Lavagem e Detecção: As películas de cola e a lamínulas foram removidas com cuidado das lâminas, que em seguida foram lavadas por duas vezes em Formamida 50%/2XSSC a 37°C por 5min cada, agitando freqüentemente. Depois, foram lavadas por três vezes em 2XSSC a 37°C por

5min cada. Foi colocado 20µl de Block I com 20µl de TNB sobre a lamínula e a lâmina invertida sobre a mesma. Esta foi incubada em câmara úmida a 37°C por 30min. Passado os 30min, a lamínula foi removida e desprezada, e imediatamente preparada outra contendo o mix de detecção (40µl de FITC-avidina, para a lâmina com sonda marcada com Biotina e 5µl de *anti-dig*, para a lâmina com sonda marcada com Digoxigenina) e incubada novamente em câmara úmida a 37°C por 30min. A lamínula foi novamente removida e a lâmina lavada três vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. Foi adicionado em outra lamínula limpa (40µl de anti-avidina, para a lâmina com sonda marcada com Biotina e 5µl de *sheep-anti mouse*, para a lâmina com sonda marcada com Digoxigenina) e incubada mais uma vez em câmara úmida a 37°C por 30min. A lamínula foi removida e a lâmina lavada três vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. Foi então adicionado em uma lamínula (40µl de FITC-avidina, para a lâmina com sonda marcada com Biotina e 10µl de Rodamina, para a lâmina com sonda marcada com Digoxigenina) e incubado em câmara úmida a 37°C por 30min. A lamínula foi removida e a lâmina novamente lavada três vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. A etapa foi concluída adicionando em uma lamínula 8µl de DAPI e a lâmina foi invertida sobre a mesma e acondicionar em freezer -20°C por no mínimo 24 horas.

Análise da lâmina: As lâminas contendo os cromossomos metafásicos foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência *BX61* (Olympus). As imagens geradas foram capturadas através de um sistema de captura e análise de imagem (Applied spectral imaging, versão 4.0) no laboratório NEOGENE da Faculdade de Medicina, da UNESP-Botucatu e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*.

4.3. Hibridação *in situ* Fluorescente

Marcação da Sonda: Foi utilizado o método de *nick translation* utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. Para marcar as sondas obtidas pela técnica de RAPD e clones obtidos pela técnica do DNA genômico autoclavado. Foi adicionado 1µl de DNA (200ng/µl), 1µl de dNTP mix, 1µl de enzima mix; H₂O

para completar 9µl de reação total. Foi misturado gentilmente, centrifugado brevemente e foi incubado por 30min a 16°C (no termociclador). A reação foi interrompida adicionando 1µl de *Stop Buffer*. Foi acrescentado 1µl de acetato de Sódio 3M e 22µl de etanol 100% gelado e misturado invertendo-se os tubos várias vezes. Foi centrifugado rapidamente e colocado no freezer -70°C por 1 hora. Foi centrifugado por 15min a 15.000rpm a 4°C, descartado o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 50µl de etanol 70% gelado e centrifugado por 5min a 15.000rpm a 4°C, descartado o sobrenadante com cuidado e deixado secar ao ar. A sonda foi ressuspensa em 6µl de água MilliQ.

Preparação da Sonda: Em um tubo Eppendorf contendo 6µl da sonda, foi adicionado 15µl de Formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Este tubo foi colocado em um termociclador e a sonda foi desnaturada a 95°C por 5min e passada imediatamente ao gelo.

Desnaturação dos Cromossomos: Foram utilizadas lâminas recém preparadas e lâminas envelhecida (pingada e guardada em freezer) e nenhum pré-tratamento foi necessário para ambas às lâminas. Estas foram desnaturadas por 2min em Formamida (diluída em 2xSSC, pH 7,0 tendo concentração final de 70%) em banho-maria a 67°C e em seguida desidratadas em série alcoólica gelada 70, 85 e 100%, por 2min cada.

Hibridação: Foi colocado 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e a lâmina invertida sobre a mesma, para evitar formação de bolhas. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C por dois dias.

Lavagem Pós-Hibridação: A lamínula foi removida e a lâmina lavada em 2xSSC, pH=7,0 em banho-maria a 72°C por 5min, sem agitação. A lâmina foi transferida para a uma solução de tampão PBS (8,5g de NaCl; 1,115g de Na₂HPO₄; 0,2g de KH₂PO₄; 100ml de água; pH=7,4) a temperatura ambiente para proceder à detecção.

Detecção: Em uma lamínula, foi aplicado 40µl de FITC-Avidina (40µl de Tampão C + 0,1µl de avidina-FITC 0,07%) e a lâmina invertida sobre a mesma. A lâmina foi incubada por 5min em câmara úmida a 37°C. A

lamínula foi removida e a lâmina lavada 3 vezes em 1xPBS a 45°C, por 2min. Em outra lamínula foi colocado 40µl de anti-avidina (2µl de anti-avidina estoque em 38µl de 1xPBS) e invertido uma lâmina sobre a mesma. Foi incubado 5min em câmara úmida a 37°C. Novamente a lamínula foi removida e a lâmina lavada 3 vezes em 1xPBS a 45°C, por 2min. Em outra lamínula, foi aplicado 40µl de FITC-Avidina e a lâmina invertida sobre a mesma. A lâmina foi incubada por 5min em câmara úmida a 37°C. A lamínula foi removida e a lâmina lavada 3 vezes em 1xPBS a 45°C, por 2min. O procedimento foi finalizado na montagem de uma lamínula com 20µl de DAPI na qual foi invertida a lâmina com o material. Guardar a lâmina por 3 dias a -20°C antes da análise.

Análise da lâmina: As lâminas contendo os cromossomos metafásicos foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência *BX61* (Olympus). As imagens geradas foram capturadas através de uma câmera digital *DP70* (Olympus) e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*.

4.4. Extração de DNA

Inicialmente, as amostras de fígados, brânquias e tecidos musculares foram retiradas de cada um dos indivíduos de *Astyanax scabripinnis* e conservados em geladeira, em álcool 95%+ EDTA 100mM (Dessauer *et al.* 1996). A presença do cromossomo B foi caracterizada por preparações cromossômicas realizadas anteriormente nos exemplares. O DNA total desses indivíduos foi extraído segundo a metodologia de Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações: Foi utilizado aproximadamente 10-30mg de tecido previamente fixado (álcool 95%+ EDTA 100mM). O tecido foi secado em papel de filtro, para retirar o excesso de fixador e macerado em cadinhos com auxílio de nitrogênio líquido. Foi adicionado 400µl da solução de digestão (Tris-HCl 1M pH 8.0; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8.0; SDS 10%; Proteinase K 10mg/ml) no material macerado e deixado em banho-maria a 50°C por aproximadamente 1 hora e 30min (a variação do tempo de digestão foi determinada de acordo com o tecido utilizado). Em seguida, Foi adicionado 400µl de PCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24: 1) ao tubo e este foi invertido cuidadosamente por 1min. O tubo foi centrifugado a

13.000rpm por 5min, separando o conteúdo do tubo em três partes. Com o auxílio de uma micropipeta, remover a primeira fase do conteúdo para um novo tubo. Neste tubo foi adicionado 600-800µl de isopropanol 100% e invertido para precipitar o DNA. Foi centrifugado a 14.000rpm por 5min e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foi adicionado 800µl de etanol 70% gelado e invertido várias vezes. O tubo foi centrifugado a 10.000rpm por 5min, o sobrenadante descartado e o DNA foi secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em um volume apropriado (geralmente 200µl) de água milliQ. Depois de completamente dissolvido (aproximadamente 30min) foi adicionado 3µl de RNase 10mg/ml, colocado em banho-maria a 37°C por 1 hora e depois por mais 15min a 65°C, para inativação da enzima. O DNA foi mantido a -20°C em tubos de 1.5ml. A integridade e a qualidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus Ladder DNA, Gibco.Brl Life Technologies), corado com brometo de etídio (10mg/ml), sob luz ultravioleta e foto-documentação dos géis, foi utilizado o programa computacional Kodak Digital Science 1D. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro.

4.5. A técnica de RAPD-PCR (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

RAPD ou AP-PCR (“*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*”), técnica descrita independentemente por Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990), foi baseada na identificação de polimorfismos do DNA através da amplificação de múltiplas regiões do genoma, utilizando *primer* único de pequeno tamanho (geralmente com 10 bases) e de seqüência arbitrária com conteúdo mínimo de 50% guanina-citosina, em reações em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizado para o presente trabalho o Kit *Ready-to-go* (Amersham Biosciences), segundo as especificações do fabricante e os produtos amplificados foram visualizados como uma série de fragmentos, de tamanhos entre 100-2000 pares de bases, detectados através de eletroforese em gel de agarose 2% utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus Ladder DNA, Gibco.Brl Life Technologies),

corado com brometo de etídio (10mg/ml), sob luz ultravioleta. A fotodocumentação dos géis, foi realizada através do programa computacional Kodak Digital Science 1D.

4.6. Purificação de DNA

A banda diagnóstica obtida para indivíduos da espécie *Astyanax scabripinnis* portadores de cromossomo B foi purificada utilizando *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), seguindo o protocolo do fabricante, com algumas modificações. Após ter sido identificada, a banda de interesse foi cortada do gel de Agarose 2% e macerada dentro do Eppendorf (1,5ml) com uma ponteira. Foi acrescentado tampão de captura (60µl de tampão para cada 20µg de gel) e o tubo foi colocado em banho-maria a 60°C por 15min. Foi centrifugado rapidamente e transferido o gel diluído para a coluna encaixada no tubo do kit e deixado por 1min a temperatura ambiente. Foi centrifugado por 1min a 13.000rpm e o líquido do tubo desprezado. Foi adicionado 500µl de tampão de lavagem do kit e centrifugado 1min a 13.000rpm e o líquido do tubo desprezado novamente. Foi adicionado 30µl de água autoclavada na coluna apoiado a um tubo definitivo, devidamente numerado. Foi centrifugado por 3min a 13.000rpm, a coluna desprezada e o DNA purificado guardado no freezer -20°C.

4.7. Isolamento de DNA repetitivo

Este procedimento foi baseado na técnica de C_{ot} -1 (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas), a qual foi fundamentada na cinética de reassociação do DNA (Zwick *et al.*, 1997). Inicialmente foi colocado 500µl de DNA genômico (100-500ng/µl diluído em 0,3M NaCl) em um Eppendorf (1,5ml) e autoclavado por 30min a 1.4atm/120°C. Foi checado o tamanho dos fragmentos obtidos em gel de Agarose 1% (ideal obter fragmentos entre 100 a 1000pb). Com DNA autoclavado foram feitas três alíquotas de 50µl cada, com os tubos devidamente numerados (zero, 1 e 5) e foram desnaturados a 95°C por 10min e imediatamente os tubos foram para o gelo. O tubo 0 (zero) foi tratado com S1 nuclease (acrescentar ao tubo 1U da enzima para 1µg de

DNA, 5,5µl de tampão 10X para o volume final de 50µl e foi incubado a 37°C por 8min e congelado imediatamente em nitrogênio líquido) e os demais tubos permaneceram no gelo por 10seg. Os tubos 1 e 5 foram colocados em banho-maria 65°C para renaturação. Após 1min, foi retirado o tubo 1 e procedido o tratamento com S1 nuclease e após 5min, foi retirado o tubo 5 para o mesmo tratamento com a S1 nuclease. Foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugado por 5min a 13.000rpm. Somente foi coletado a fase aquosa e passada para um tubo novo, devidamente numerado. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e deixado no freezer -70°C por 30min. Foi centrifugado por 15min a 15.000rpm a 4 °C e deixado secar por completo. O DNA foi eluído em 50µl de água MilliQ autoclavada e Foi checado em gel de agarose 1%. Após a verificação do DNA em gel, foi utilizado 1µl do DNA renaturado para ligar a vetores plasmidiais para posterior clonagem, como descrito no item a seguir (4.8).

4.8. Clonagem

Para a clonagem do DNA foi utilizado o kit de vetores, o *pMOS Blue Blunt Vector* (Amersham biosciences). Os Plasmídeos recombinantes foram identificados através da PCR e os clones de interesse foram estocados a -70°C em glicerol 15%. Os procedimentos adotados para clonagem de tais fragmentos de DNA encontram-se detalhados nos protocolos descritos a seguir:

4.8.1. Ligação inserto-plasmídeo

Os fragmentos obtidos pela autoclavagem do DNA genômico foram ligados aos plasmídeos *pMOS Blue Blunt Vector*, utilizando o kit de ligação *pMOS Blue Blunt Ended Cloning Kit* (Amersham biosciences) seguindo as especificações do fabricante. Em um tubo de 0.5ml, Foi adicionado 1µl do inserto de interesse (fragmentos de DNA autoclavado), 0,5µl DTT 100mM, 1µl pK enzima mix, 6,5µl de água MilliQ, 1µl de tampão de reação 10x e acondicionado em termociclador programado para 22 °C por 40min, 72 °C por 10min e então colocado no gelo rapidamente por 2min para prosseguir com a

ligação. Foi acrescentado 1µl de vetor *pMOS Blue Blunt* (50ng/µl) e 1µl de T4 DNA ligase e misturado cuidadosamente com uma micropipeta. A reação foi incubada a 22°C durante 12-16 horas. Os produtos das ligações inserto-plasmídeo foram posteriormente utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies).

4.8.2. Transformação de bactérias competentes

A transformação de bactérias foi realizada utilizando células competentes da linhagem *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. Em um Eppendorf (1.5ml) mantido no gelo foi colocar 50µl de bactérias competentes, que estavam acondicionadas a -70°C. Neste tubo foi adicionado 5µl da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. o tubo foi mantido no gelo por 30min. Posteriormente, foi aplicado um choque térmico, aquecendo este mesmo tubo em banho-maria a 42°C por exatamente 40 segundos. imediatamente o tubo foi colocado no gelo e mantido por 2min. Foi adicionado 80µl de meio *SOC medium* (RT) à temperatura ambiente e incubado a 37°C por 1hora, sob agitação a 200-250rpm. O produto da transformação foi espalhado em placas de *Petri* estéreis com meio LB sólido (peptona 1%; NaCl 0.17M; extrato de levedura 0.5%; agar 1.5%; pH 7.5), contendo 2µl de ampicilina (50mg/ml) por mililitro de meio LB e 35µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside) (50mg/ml) e 25µl de IPTG, para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). As placas foram incubadas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C durante 12-16 horas.

4.8.3. Identificação de plasmídeos recombinantes

Os plasmídeos recombinantes foram identificados através de PCR utilizando *primers* específicos para o plasmídeo utilizado, seguindo o protocolo descrito abaixo. Em um Eppendorf (0.5ml), foi adicionado 50pmol de cada *primer* - M13F (5'- 3') AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG, e M13R (5'- 3') CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG -, tampão de reação 1x (KCl 50mM; MgCl₂ 1.5mM; Tris-HCl 10mM), 2mM de cada dNTP 8mM e 0.5U de *Taq* DNA

polimerase (Amersham Pharmacia Biotech), em um volume total de 50 μ l. Depois da reação pronta, com auxílio de uma ponteira estéril, foram transferidas cada uma das colônias recombinantes de interesse para o tubo contendo as soluções para amplificação e devidamente marcados. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 80°C por 1min; 95°C por 3min, de 34 ciclos com desnaturação a 95°C por 30segundos, hibridação a 50°C por 1minuto e extensão a 72°C por 2min e seguida de extensão final de 72°C por 5min. Os produtos da reação de amplificação (6 μ l) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a presença de recombinantes de interesse. Insertos presentes nos plasmídeos foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador, utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus Ladder DNA, Gibco.Brl Life Technologies). Após identificação dos clones de interesse estes foram estocados a -70°C em glicerol 15%, em Eppendorf (1.5ml) estéreis e isolados, como descritos no tópico 4.8.4.

4.8.4. Isolamento e purificação dos fragmentos obtidos

Reações de mini-preparações vêm sendo bastante utilizadas para isolamento dos segmentos de DNA clonados e refere-se à técnica de lise alcalina, descrita em Sambrook & Russell (2001), conforme discriminado abaixo. Com auxílio de uma ponteira, as colônias de bactérias recombinantes (colônias brancas) foram coletadas das placas de Petri, após a verificação do inserto pela PCR. Estas ponteiras foram mergulhadas, uma a uma, em tubos (15ml) contendo 4ml de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5), com cloranfenicol (1 μ l- 20mg/ml- para cada 1ml de meio líquido) devidamente numerados. Estes foram mantidos a 37°C durante 12-18 horas, sob agitação a 225rpm. Após esse tempo, foi retirada uma alíquota desse material (1ml) em um Eppendorf (1,5ml) o qual foi centrifugado a 3.000rpm por 10min. a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μ l de solução 1 (50mM tris-HCl pH8; 10mM EDTA pH8; 10 μ g/ml de RNase) e em seguida, foi adicionado 110 μ l da solução 2 (SDS 1%; 200mM NaOH) e

cuidadosamente os tubos foram rotacionados em um ângulo de 80° exatamente 20x (este passo foi executado no máximo em 5 minutos, pois se passando este, o DNA iniciará o processo de desnaturação). Logo após foi acrescentado 110µl da solução 3 (acetato de potássio 3M, pH5,5) e rotacionado completamente os tubos (360°) 15 vezes sem agitação. Foi centrifugado rapidamente (spin) e deixado a 4°C por 10min na própria centrífuga e depois foi ligada a 6.000rpm por 15min. O sobrenadante foi passado para um novo tubo, devidamente identificado, evitando-se o precipitado, Foi adicionado dois volumes de etanol 100% gelado e o tudo invertido 20x e colocado no freezer -70°C por uma hora. Este foi centrifugado a 6.000rpm por 10min a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 200µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 6.000rpm por 3min a 4°C, o sobrenadante desprezado novamente e o tubo colocado para secar a 42°C por aproximadamente 15 min. O DNA foi eluído em 30µl de água MilliQ e estocado em freezer. Uma alíquota de cada amostra foi aplicada em gel de agarose 1%, juntamente com um DNA de concentração e qualidade conhecidas, para verificar sua qualidade.

4.9. Seqüenciamento nucleotídico

Os fragmentos de DNA de interesse clonados foram seqüenciados automaticamente para determinação de sua seqüência nucleotídicas. Para esta metodologia foi utilizado o *DYEnamic ET terminator cycle sequencing Kit* (Amersham Biosciences). Para um total de 10µl de reação, foi usado 2µl de *pré mix*, 2µl de *primer* 10µm (M13F (5'AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3' foward), 4µl água MilliQ autoclavada e 1µl DNA purificado. Para a reação de amplificação para seqüenciamento foi utilizado termociclador PTC-100™ (MJ Research) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 2min, de 25 ciclos com desnaturação a 95°C por 45seg, hibridação a 50°C por 30seg e extensão a 60°C por 2min. Em seguida, foi adicionado 2µl de acetato de sódio/EDTA; 80µl de etanol 95% gelado e passado no vortex. Foi centrifugado 20min a 16.000rpm a 4°C e o sobrenadante desprezado. Foi colocado 400µl etanol 70% gelado, centrifugado por 10min a 16.000rpm a 4°C e o sobrenadante descartado e

colocado para secar a 37°C por 1 hora. Foi acrescentado ao DNA seco um tampão de carregamento (5µl de formamida e 2µl de corante *blue*) e desnaturado no termociclador por 5min a 95 °C, sendo então logo em seguida aplicado no gel de poliacrilamida para seqüenciamento. O seqüenciamento das amostras de DNA foi realizado automaticamente, no seqüenciador ABI 377, seguindo as especificações do fabricante.

4.9.1. Análise das seqüências nucleotídicas

As seqüências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas Blastn (Altschul *et al.*, 1990) e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), através do “website” (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) e o alinhamento final das seqüências consenso foi realizado manualmente.



Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados nos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* resultaram na proposta de artigos científicos que são apresentados a seguir, em forma de capítulos. As referências bibliográficas específicas encontram-se relacionadas nos artigos e nas citações gerais.

Capítulo I – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS À PRESENÇA DE CROMOSSOMOS B EM *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) ATRAVÉS DE RAPD.

Capítulo II – IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) UTILIZANDO MICRODISSECAÇÃO CROMOSSÔMICA.

Capítulo III – MAPEAMENTO DE SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA EM CROMOSSOMOS B DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).

CAPÍTULO I

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS À
PRESENÇA DE CROMOSSOMOS B EM *Astyanax scabripinnis*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) ATRAVÉS DE RAPD.**

“O importante é não parar nunca de questionar”

Albert Einstein

RESUMO

A espécie *Astyanax scabripinnis*, tem se mostrado um modelo bastante interessante para estudos citogenéticos entre os peixes, tanto pela sua ampla ocorrência e distribuição, como pelo grande polimorfismo cromossômico que apresenta. Caracterizado também pela presença de cromossomos supranumerários, tornando-se uma das espécies mais estudadas cromossomicamente da ictiofauna neotropical. A amplificação de segmentos de DNA utilizando a técnica de RAPD foi a estratégia utilizada para isolar seqüências presentes nos cromossomos B, a partir de “pool” de DNA total de indivíduos portadores de cromossomo B e de “pool” de não portadores desse cromossomo. Foram testados 32 *primers*, dos quais apenas dois apresentaram banda diagnóstica para o “pool” de DNA de indivíduos portadores de cromossomo B. A partir desse resultado, os mesmos dois *primers* foram testados em todos os indivíduos separadamente e confirmada a presença ou a ausência da banda. Todos os indivíduos coletados no córrego Cascatinha, portadores de cromossomo B, apresentaram a banda. Porém, nos indivíduos coletados no Riacho da Madalena essa banda diagnóstica não estava presente. O *Primer* 1 apresentou uma banda de 1000pb e o *primer* 7 de 900pb, aproximadamente. Estas bandas foram cortadas do gel de agarose 1%, purificadas e produzidas sondas para hibridação “*in situ*” fluorescente. Ambas as sondas produzidas, AsRI e AsRVII, apresentaram homologia com o cromossomo B dos indivíduos da população do córrego Cascatinha, sendo que nenhuma outra marcação foi evidenciada nos cromossomos B dos indivíduos coletados no Riacho da Madalena e nos cromossomos do complemento normal de indivíduos de ambas as localidades, sugerindo origem e evolução independentes destes segmentos genômicos. A partir do seqüenciamento destas sondas e da sua hibridação com preparações de outras populações de *Astyanax scabripinnis*, portadores de cromossomos B será possível chegar a um melhor conhecimento da composição destes cromossomos especiais e de se formular hipóteses sobre sua origem e evolução.

Palavra Chave: Characidae, RAPD, Cromossomo B, FISH

INTRODUÇÃO

A espécie *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921), é conhecida popularmente como lambari, apresenta grande diversidade morfológica e cariotípica além de ampla distribuição geográfica, predominante na América do Sul (Fernandes & Martins-Santos, 2005). Esta espécie também tem mostrado um auto grau de polimorfismo cromossômico, caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários, sendo considerada componente de um complexo de espécie denominado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) “complexo *scabripinnis*”.

As razões para esta diversidade estão nas características Biológicas desta espécie de peixe de água doce, que pode formar pequenas populações isoladas e estabelecer estrutura para uma evolução particular independente, resultando assim em rearranjos cromossômicos distintos que são fixados em algumas populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Desde os primeiros estudos e descrições, no início dos anos 90 por Salvador & Moreira-Filho (1992), esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo atualmente um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna neotropical.

Muitos relatos a respeito de cromossomo B foram feitos e muitas hipóteses sobre a origem e a manutenção desses cromossomos nas populações de *Astyanax scabripinnis* foram levantadas. Salvador & Moreira-Filho (1992) e Maistro *et al.* (1992) consideraram a hipótese de que os cromossomos B encontrados nesta espécie seriam resultado de um evento de não-disjunção envolvendo um dos elementos do primeiro par de metacêntricos grandes, seguido de um processo de heterocromatinização total ou parcial. Entretanto, estudos sobre as características deste B metacêntrico comumente encontrado em *Astyanax scabripinnis*, tem evidenciado sua ocorrência em diferentes populações de bacias hidrográficas distintas sugerindo um caracter de ancestralidade para este cromossomo nesta espécie (Neo *et al.*, 2000a).

O termo “cromossomo B” inclui uma variedade de tipos de cromossomos extras que mostram uma heterogeneidade conspícua em sua natureza, comportamento e dinâmica evolutiva. Por esta razão, não existe

uma definição definitiva sobre o que é um cromossomo B, mas um consenso de definições proposto por Camacho & Parker (1993), durante a primeira conferência sobre cromossomo B, segundo a qual “Cromossomos B são cromossomos adicionais dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações em algumas espécies, que provavelmente originaram-se dos cromossomos A, mas seguiram sua própria evolução”. Esta definição aparentemente resume a maioria das propriedades dos cromossomos B (Camacho, 2005).

Embora já existam inúmeros estudos com vários tipos de abordagem e em diversos grupos de organismos, com a finalidade de se entender a origem e possíveis funções do enigmático cromossomo B, existem ainda muitas perguntas sem respostas. Desta forma, as pesquisas realizadas neste trabalho têm a finalidade de buscar uma melhor compreensão das características estruturais destes cromossomos, para compreensão dos mecanismos da sua fixação e manutenção nas populações e da sua verdadeira função, buscando desvendar o verdadeiro papel desses cromossomos B no genoma dessa espécie.

A aplicação da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), desenvolvida por Kary Mullis em 1984 e a utilização de metodologias envolvendo o uso de RAPD, entre outras, podem fornecer uma vasta gama de marcadores do genoma nuclear (Stepien & Kocher, 1997). Tais marcadores têm sido extensivamente utilizados por apresentarem atributos favoráveis para estudos de conservação e diversidade genética, por serem abundantes e apresentarem altos níveis de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Apesar da potencialidade da técnica de RAPD e de outras que utilizam a técnica de PCR, são poucos ainda os trabalhos envolvendo este tipo de marcador molecular em cromossomos supranumerários de diferentes grupos de organismos. Gourmet & Rayburn (1996) trabalharam com milho *Zea mays*, encontrando associação entre marcadores moleculares do tipo RAPD e cromossomos B em uma análise populacional, utilizando quatro *primers* e conduzindo pesquisa envolvendo mapeamento, origem e evolução dos cromossomos B. Tosta *et al.* (1998) também descobriram um marcador RAPD associado a cromossomo B em abelhas operárias da espécie *Partamona*

helleri, do mesmo modo que Levin *et al.* (1993) em galinhas, Kim *et al.* (1996) em humanos, Vogel *et al.* (1997) em bovinos, Stein *et al.* (2001) em salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) e Kovács *et al.* (2001) em catfish (*Clarias gariepinus*), entre outros, identificaram seqüências específicas de cromossomos sexuais por meio do RAPD. Assim também os trabalhos de Tanic *et al.* (2000), Qi *et al.* (2002), Ziegler *et al.* (2003) e Schmid *et al.* (2006), mostram que técnicas com base em PCR como AP-PCR, AFLP entre outras, podem ser usadas para detecção de seqüências específicas dos cromossomos B, como demonstrado por Lin & Chou (1997), em *Zea mays*, que resultaram num mapa físico desta espécie. Neste sentido, a aplicação destas técnicas em cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* portadores podem resultar em informações importantes sobre a sua estrutura e composição, além de possibilitar a formulação de hipóteses sobre a origem e evolução desses enigmáticos cromossomos nos peixes e, portanto, nos vertebrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

Foram coletados e analisados 28 exemplares (18 fêmeas e 10 machos) de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cascatinha (Botucatu-SP), componente da bacia hidrográfica do rio Tietê e 7 indivíduos (3 fêmeas e 4 machos) no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), componente da bacia hidrográfica do rio Pardo (afluente do rio Paranapanema). O processamento do material e sua análise molecular foram realizados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, em Botucatu, SP. Os exemplares utilizados na amostragem foram identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório.

Processamento das amostras

Preparação Cromossômica:

Nas preparações cromossômicas para análise citogenética dos exemplares foram utilizadas células do tecido renal, seguindo a metodologia

descrita por Foresti *et al.* (1993); o bandeamento C, segundo Sumner (1972). Os dados citogenéticos permitiram identificar nas amostras coletados os indivíduos portadores de cromossomo B.

Processamento do DNA total:

O DNA total dos indivíduos foi extraído de amostras de tecido muscular e do fígado, seguindo-se a metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. A partir do DNA total foi retirado uma alíquota de cada um dos indivíduos para reuni-los em dois tubos, um tubo contendo “pool” de DNA total dos indivíduos portadores de cromossomo B e o outro com “pool” de DNA total de indivíduos não portadores de cromossomos B, os quais serviram de suporte para a aplicação da técnica de RAPD e isolamento de seqüências específicas deste tipo de cromossomo.

Obtenção e isolamento do fragmento específico:

O DNA total foi amplificado utilizando-se a técnica de RAPD (“Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”) ou AP-PCR (“Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”), técnica descrita independentemente por Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990). Utilizando-se para o presente trabalho o Kit *Ready-to-go* (Amersham Biosciences). A banda diagnóstica obtida para indivíduos da espécie *A. scabripinnis* portadores de cromossomo B, foi purificada pelo *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante.

Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* foi realizada segundo Martins & Galetti Jr (2001), com algumas modificações. O DNA específico purificado foi marcado com o Kit *BioNick™ Labeling System* (Invitrogen), seguindo-se as especificações do fabricante. A sonda foi preparada e desnaturada a 95°C por 5 minutos e passada ao gelo imediatamente. Utilizou-se lâminas recém preparadas e lâminas pingadas guardadas no freezer (-20 °C). Nenhum pré-

tratamento foi realizado. O DNA cromossômico foi desnaturado por 2 min em formamida 70% a 67°C e então desidratado em série alcoólica gelada 70, 85 e 100%, por 2 minutos cada. Foram acrescentados 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e invertida a lâmina contendo o material sobre a mesma. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C *overnight*. Sendo então a lamínula removida, a preparação lavada em 2xSSC, pH=7,0 a 72°C em banho Maria sem agitação, por 5 minutos, transferindo-se para a solução de tampão PBS (8,5g de NaCl; 1,115g de Na₂HPO₄; 0,2g de KH₂PO₄; 100ml de água; pH=7,4) a temperatura ambiente para proceder à detecção. A detecção e amplificação do sinal de hibridação foram feitas com Fluoresceína-avidina conjugada (FITC) e anti-avidina biotilada. A lâmina foi contra-corada com DAPI e guardada a -20°C por 3 dias antes da análise.

Análise dos dados:

A amplificação utilizando a técnica de RAPD foi à estratégia para isolar seqüências presentes nos cromossomos B. Após serem quantificadas em espectrofotômetro separadamente em 50ng cada, as amostras utilizadas foram agrupadas em 2 “pools”, sendo “pool A” (DNA total de 7 indivíduos, machos e fêmeas, que não apresentam cromossomo B) e “pool B” (DNA total de 7 indivíduos, machos e fêmeas, que apresentam cromossomo B). Experimentos de dinâmica de RAPD foram testados utilizando-se 32 *primers* diferentes para amplificar o DNA total de *Astyanax scabripinnis* a partir destas duas amostras (“pool A” e “pool B”). O DNA amplificado foi corrido em gel de agarose 2% utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus Ladder DNA, Gibco.Brl Life Technologies), corado com brometo de etídio (10mg/ml), sob luz ultravioleta e foto-documentação dos géis, foi utilizado o programa computacional Kodak Digital Science 1D, dos quais apenas dois *primers* diagnosticaram banda específica para indivíduos portadores de cromossomo B. Posteriormente o DNA de todos os indivíduos, empregando os mesmos dois *primers*, foram submetido à mesma técnica para confirmação da repetibilidade dessas bandas diagnosticadas. Estas foram cortadas do gel de agarose 2%, uma a uma, colocadas em tubos de

Eppendorf, devidamente identificados e separadas para serem purificadas e produzidas sondas, nomeadas de AsRI e AsRVII. Estas sondas foram marcadas e hibridizadas em cromossomos metafásicos de *Astyanax scabripinnis* coletados nas duas localidades, nos indivíduos com e sem cromossomos B. As lâminas hibridizadas foram analisadas e fotodocumentadas no fotomicroscópio de fluorescência BX61 (Olympus). As imagens foram capturadas através de uma câmera digital DP70 (Olympus) e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas populações de *Astyanax scabripinnis* estudadas neste trabalho já tinham seu padrão cariotípico bem determinado. Os indivíduos coletados no córrego Cascatinha, pertencente à Bacia do Rio Tietê (Botucatu-SP), apresentaram $2n=50$, porém os indivíduos que apresentaram cromossomos supranumerários tinham $2n=51$, ou seja, 25 pares de cromossômicos do complemento (A) e um cromossomo que não possui homologia com nenhum dos outros cromossomos do complemento, chamados de cromossomo B. Os indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena pertencente à Bacia do Rio Pardo (Botucatu-SP) apresentaram $2n=46$, sendo os indivíduos que apresentaram cromossomos supranumerários tinham $2n=47$, ou seja, 23 pares de cromossômicos do complemento (A) e um cromossomo B, como já descritos anteriormente por Maistro *et al.* (1994a), Porto-Foresti *et al.* (1997), Maistro *et al.* (1998), Maistro *et al.* (2001) e Vieira (2001).

Entre os 28 exemplares de *Astyanax scabripinnis* coletados no córrego Cascatinha (Botucatu-SP), 10 apresentaram cromossomo B e dos 7 indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), 3 apresentaram cromossomos supranumerários. Apesar da diferença encontrada nos números diplóides, os indivíduos portadores de cromossomo supranumerário não apresentaram diferenças morfológicas aparentes, para ambas as localidades.

Através do bandeamento C foi possível observar diferenças no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos B

da espécie *Astyanax scabripinnis*. Nos indivíduos coletados no Córrego Cascatinha que foram submetidos ao bandeamento C, os cromossomos B apresentam-se homogeneamente corado (Figura 2a), com coloração mais clara, contudo, do que as bandas heterocromáticas encontradas nos cromossomos do complemento A (Figura 2). Esta característica foi nomeada de pseudo-heterocromática. Segundo descrição de Maistro *et al.* (2001), o cromossomo B presente em alguns indivíduos analisados do Córrego Cascatinha apresentou-se fortemente heterocromático por inteiro, quando submetido ao mesmo procedimento. Tal diferença de coloração não foi, contudo, analisada em detalhe, uma vez que poderia estar relacionada a procedimentos metodológicos e tratar-se de limitação proporcionada pelo processo realizado utilizando filmes e ampliações manuais em papel Kodak, nos resultados descritos por aqueles autores. Neste trabalho as imagens foram capturadas no fotomicroscópio através de uma câmera digital DP70 (Olympus) e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*.

Na população Ribeirão Água da Madalena o cromossomo B apresenta-se “zebrado” com faixas heterocromáticas e eucromáticas intercaladas, como anteriormente descrito por Vieira (2001).

A amplificação do DNA genômico pela técnica de RAPD de 35 indivíduos coletados nas duas localidades, previamente cariotipados para identificação dos indivíduos portadores de cromossomos B, possibilitou caracterizar dois potenciais segmentos de DNA B-específicos de *Astyanax scabripinnis* (Figura 3,4 e 5). Apenas com utilização do Kit *Ready-to-go* (Amersham biosciences) e seguindo as especificações do fabricante, foi possível obter banda diagnóstica (banda que só foi visualizada em indivíduos com cromossomo B). Com a utilização do mesmo obteve-se repetibilidade dos padrões de bandas analisados para cada *primer*, possibilitando assim inferir relações entre a banda diagnosticada com a presença de cromossomo supranumerário. A partir desse resultado, os dois primers foram testados em todos os indivíduos separadamente e confirmada à presença ou ausência da banda utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus Ladder DNA, Gibco.Brl Life Technologies), corado com brometo de etídio (10mg/ml). Foi também colocado junto às amostras no gel

de agarose um controle negativo, consistindo de todos os componentes exceto DNA genômico, para monitorar quaisquer possíveis contaminações em relação à banda diagnóstica.

O *Primer* 1 (5' GTAGCACTCC 3') apresentou uma banda de 900pb e o *primer* 7 (5' GTCCATGCCA 3') de 1000pb, aproximadamente (Figura 3). Contudo, na análise conjunta das amostras de ambas as localidades, observou-se que alguns indivíduos portadores de cromossomo B, não apresentavam a banda diagnóstica (Figuras 4 e 5). Sendo assim a identificação dos potenciais segmentos de DNA B-específicos de *Astyanax scabripinnis* foi possível apenas para os indivíduos que possuem cromossomo B do Córrego Cascatinha, tanto para o *primer* 1 quanto para o *primer* 7. O forte sinal destas bandas indica que se trata de DNA altamente repetitivo como mostram as Figuras 3, 4 e 5.

Como está evidente, nesta espécie existem diferenças morfológicas (padrão de banda C) entre os cromossomos supranumerários das duas localidades, como foi abordado anteriormente. Pela aplicação da técnica de RAPD também foi possível separá-los, pois somente os indivíduos portadores de cromossomos B coletados no córrego Cascatinha apresentaram a banda diagnóstica para os dois *primers* (Figuras. 4 e 5). Pode-se dizer assim que, o uso de marcadores desta natureza é bastante eficiente para a identificação destes cromossomos.

A técnica de RAPD, já foi utilizada em outros trabalhos para identificar marcador associado aos cromossomos B, tanto em milho da espécie *Zea mays* (Gourmet & Rayburn, 1996) quanto em abelhas operárias de *Partamona helleri* (Tosta *et al.*, 1998, 1999 e 2004). Além disso, dados obtidos por Levin *et al.* (1993) em galinhas; Stein *et al.* (2001) em salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) e Kovács *et al.* (2001) em catfish (*Clarias gariepinus*), entre outros, revelam a identificação de seqüências específicas de cromossomos sexuais por meio do RAPD, enquanto Tanic *et al.* (2000); Qi *et al.* (2002); Ziegler *et al.* 2003 e Schmid *et al.*, 2006 mostram que outras técnicas com base em PCR como, AP-PCR e AFLP, podem ser usadas para detecção de seqüências específicas dos cromossomos B.

Com o intuito de aumentar a concentração de DNA durante a recuperação da banda cortada do gel de agarose 2%, foram realizadas três ampliações do DNA do mesmo indivíduo. Após a excisão, a banda marcadora foi purificada e o DNA presente na mesma foi submetido à eletroforese para checagem e quantificação. A banda obtida a partir da eletroforese deste DNA purificado mostrou padrão eletroforético semelhante ao da banda excisada, demonstrando confiabilidade e adequação do método utilizado (dado não mostrado).

Stark *et al.* (1996) foi o primeiro a isolar seqüências específicas de cromossomo B de Milho (*Zea mays*) e posteriormente Tosta *et al.* (1998) que isolou seqüências específicas de cromossomo B de abelhas (*Partamona helleri*). Contudo, este consiste do primeiro trabalho que isolou seqüências específicas de cromossomo B de peixes utilizando um marcador RAPD associado a cromossomo supranumerário.

Os DNAs purificados, das bandas diagnósticas, foram marcados com o Kit *BioNick™ Labeling System* (Invitrogen), seguindo-se as especificações do fabricante, dos quais foram produzidas as sondas denominadas de AsRI (DNA dos indivíduos amplificados com o *primer 1*) e AsRVII (DNA dos indivíduos amplificados com o *primer 7*) e que foram utilizadas na hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), tem sido utilizada freqüentemente para análise de estrutura de cromossomos B, em várias espécies como no centeio (*Secale cereale*) (Cuadrado & Jouve, 1994; Wilkes *et al.*, 1995); em *Brachycome dichrossomatica* (Donald *et al.*, 1995); em gafanhotos (*Eyprepocnemis plorans*) (López-Leon *et al.*, 1994); em *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht *et al.*, 1995), no rato do banhado (*nectomys*) (Silva & Yassuda, 1998); em milho (Qi *et al.*, 2002); em peixes *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000) e *Alburnus alburnus* (Ziegler *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2006), entre outros.

No presente trabalho também foi utilizada a técnica de FISH para localizar as sondas AsRI e AsRVII, que apresentaram homologia apenas com o cromossomo B dos indivíduos coletados no Córrego Cascatinha, não sendo observadas marcações em nenhum dos demais cromossomos do

complemento padrão. Com estas mesmas sondas, também não foram evidenciadas marcações nos cromossomos B dos indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena, bem como nos demais cromossomos do complemento normal (Figura 6 e 7).

As mesmas sondas foram colocadas para hibridar em lâminas com os cromossomos metafásicos de outros indivíduos da mesma população, porém sem o cromossomo supranumerário, e o resultado foi à ausência de marcação nos cromossomos do complemento. Resultado semelhante também foi encontrado por Schmid *et al.* (2006) em peixes da espécie *Alburnus alburnus*, o que levou os autores a sugerirem que o cromossomo supranumerário não teria se originado dos cromossomos do complemento padrão, mas teria evoluído independentemente, nesta espécie.

De modo semelhante, os resultados obtidos no presente trabalho podem indicar que cromossomos supranumerários identificados nos indivíduos das duas populações estudadas poderiam ter tido a mesma origem, porém passando na sua transição para a neutralidade ou “parasitismo”, por diferentes processos de heterocromatinização dos elementos, conforme proposto por Jones & Rees (1982). Na trajetória comum de evolução dos cromossomos B; ou ainda, após terem tido a mesma origem, teriam passado por processos de evolução independentes, como proposto por alguns pesquisadores como Beukeboom (1994).

Neste caso, os cromossomos B teriam tido inicialmente evolução paralela à dos cromossomos A, sofrendo posteriormente alterações que os tornariam diferentes dentro do genoma de seus portadores. Assim, populações de *Astyanax scabripinnis* com ampla distribuição e com presença de indivíduos com cromossomo B, inicialmente portadoras de cariótipo comum, poderiam ter iniciado processos de modificação cariotípica, com decorrências na macro e micro estrutura do genoma. O resultado poderia ser observado como cariótipos diferenciados nas populações atuais e cromossomos B específicos com segmentos heterocromáticos próprios e elementos supranumerários individualizados.

FIGURAS

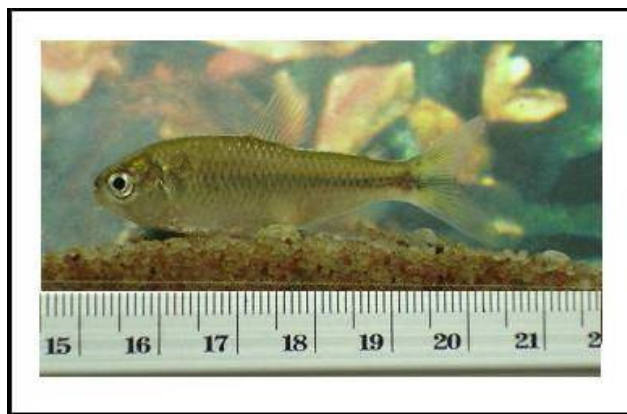


Figura. 1: Exemplo de *Astyanax scabripinnis* coletado no Córrego Cascatinha (Botucatu-SP).

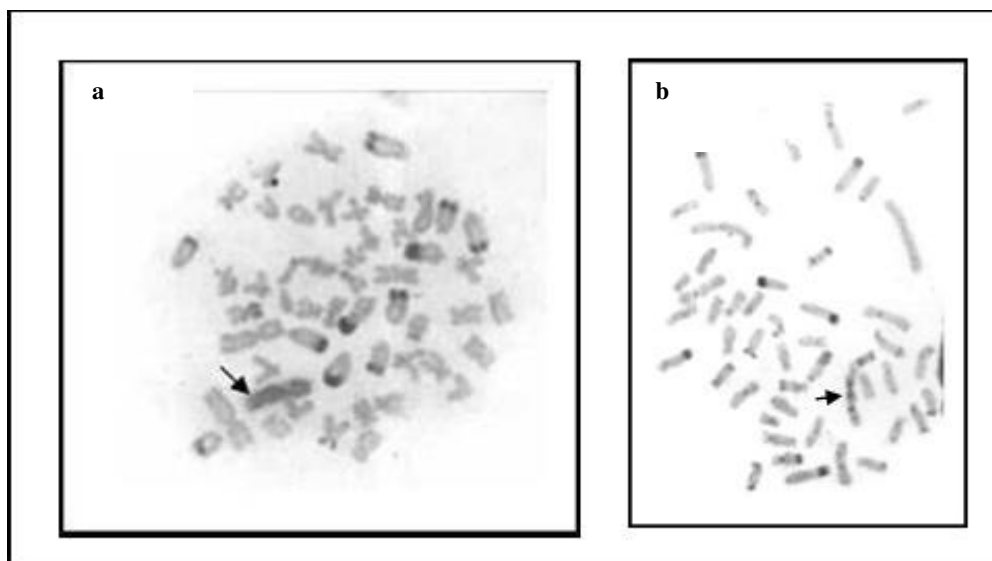


Figura 2: Metáfases somáticas de *Astyanax scabripinnis* submetidas ao tratamento com hidróxido de Bário (Banda C) evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. **a)** Metáfase de um indivíduo coletado no córrego Cascatinha (Botucatu-SP) com $2n=51$ cromossomos; a seta indica o cromossomo supranumerário “pseudo-heterocromático”. **b)** Metáfase de um indivíduo coletado no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), com $2n=47$ cromossomos; a seta indica o cromossomo supranumerário que se apresenta com faixas heterocromáticas e faixas eucromáticas “zebrado”.

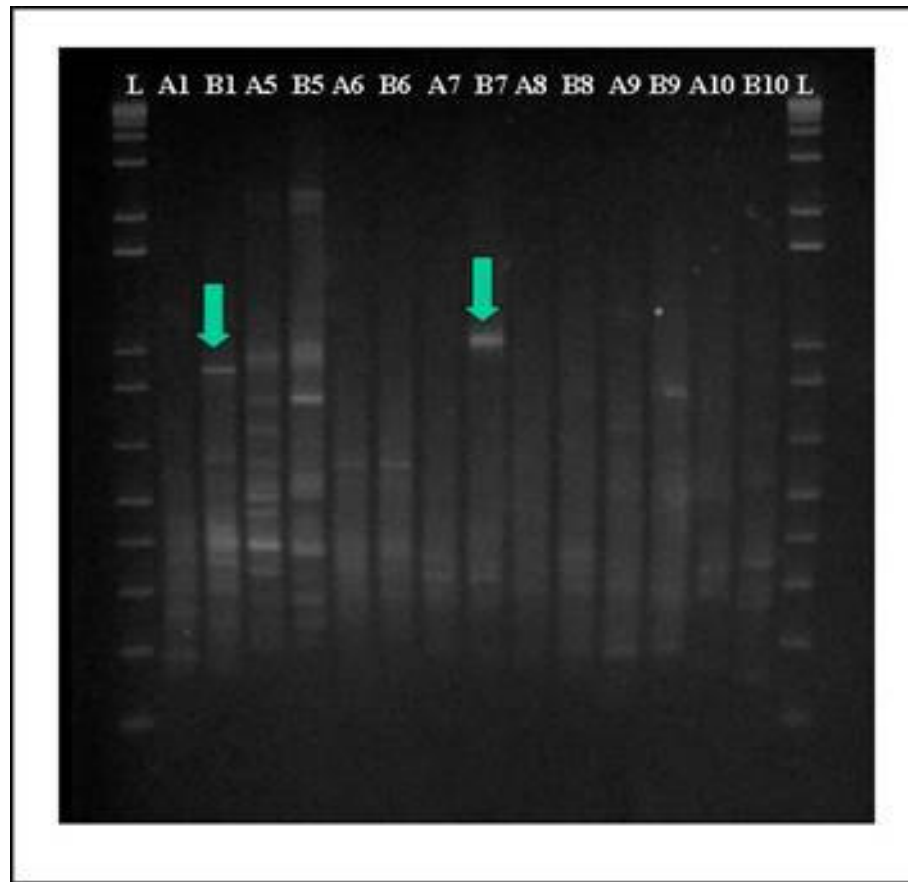


Figura. 3: Amostras do “pool A” (DNA total de 7 indivíduos, machos e fêmeas, que não apresentam cromossomo B) e “pool B” (DNA total de 7 indivíduos, machos e fêmeas, que apresentam cromossomo B) de *Astyanax scabripinnis* amplificado por RAPD, de apenas 7 *primer* dos 32 analisados. (L: 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. Brl, **A1:** “pool A” amplificado com o *primer* 1; **B1:** “pool B” amplificado com o *primer* 1; **A5:** “pool A” amplificado com o *primer* 5; **B5:** “pool B” amplificado com o *primer* 5; **A6:** “pool A” amplificado com o *primer* 6; **B6:** “pool B” amplificado com o *primer* 6; **A7:** “pool A” amplificado com o *primer* 7; **B7:** “pool B” amplificado com o *primer* 7; **A8:** “pool A” amplificado com o *primer* 8; **B8:** “pool B” amplificado com o *primer* 8; **A9:** “pool A” amplificado com o *primer* 9; **B9:** “pool B” amplificado com o *primer* 9; **A10:** “pool A” amplificado com o *primer* 10; **B10:** “pool B” amplificado com o *primer* 1. As setas indicam as bandas diagnósticas encontradas para o “pool B” obtidas pelos primers 1 e 7, respectivamente.

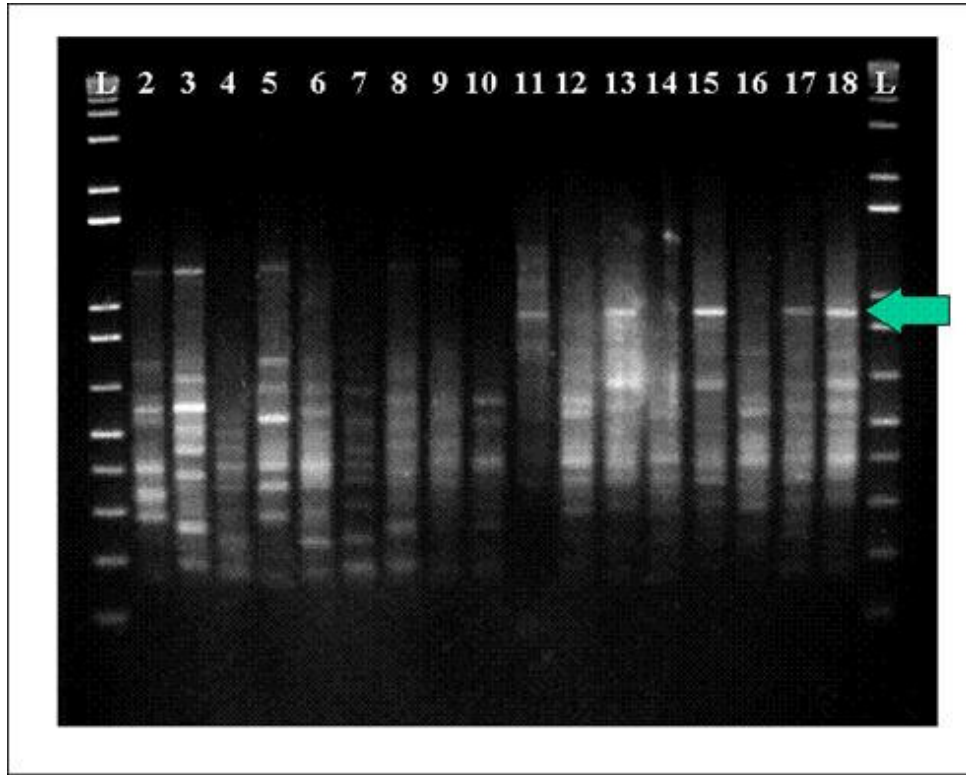


Figura. 4: Amostras dos indivíduos contidos nos “pool A” e “pool B” de *Astyanax scabripinnis* amplificado separadamente por RAPD, utilizando *primer 1*. (**L**: 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. Brl, **2 a 8**: indivíduos que não apresentam cromossomo B; **9**: “pool A” amplificado com o *primer 1*; **10**: controle negativo; **11**: “pool B” amplificado com o *primer 1*; **12 a 18**: indivíduos que apresentam cromossomo B. A seta indica a banda diagnóstica encontrada para indivíduos portadores de cromossomo B utilizando *primer 1*. Os indivíduos 12, 14 e 16, não apresentaram a banda diagnóstica, e representam parte da amostragem coletada no Ribeirão Água da Madalena, os demais indivíduos (13, 15, 17 e 18) que apresentam a banda são do outro ponto de coleta, do Córrego Cascatinha.

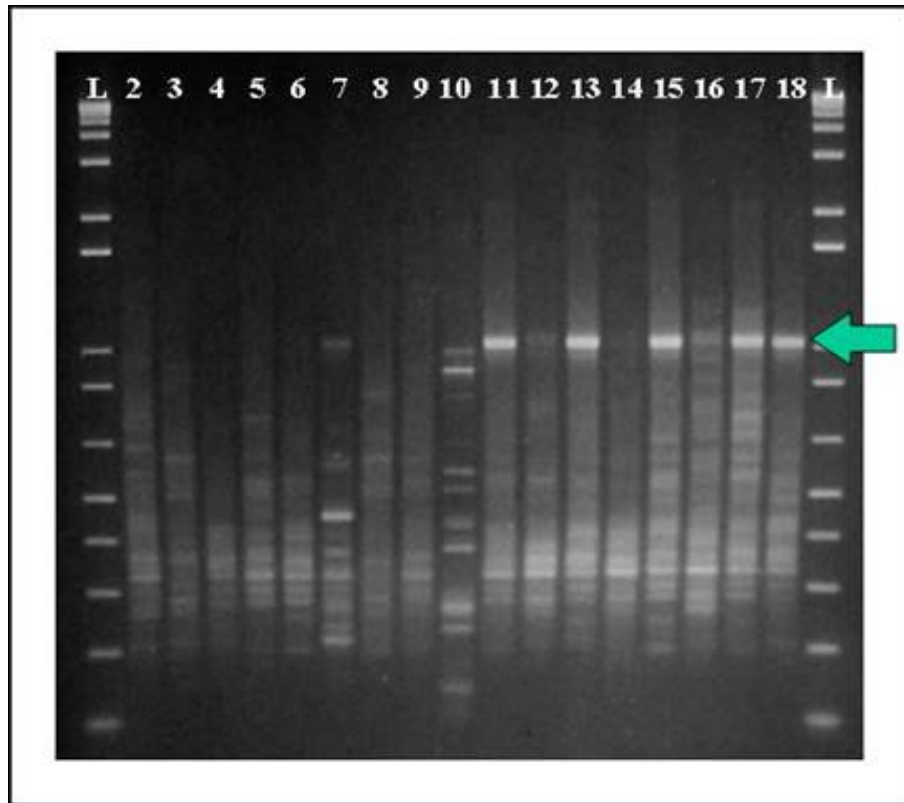


Figura. 5: Amostras dos indivíduos contidos nos “*pool A*” e “*pool B*” de *Astyanax scabripinnis* amplificados separadamente por RAPD, utilizando *primer 7*. (**L**: 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. Brl, **2 a 8**: indivíduos que não apresentam cromossomo B; **9**: “*pool A*” amplificado com o *primer 7*; **10**: controle negativo; **11**: “*pool B*” amplificado com o *primer 7*; **12 a 18**: indivíduos que apresentam cromossomo B. A seta indica a banda diagnóstica encontrada para o “*pool B*” utilizando *primer 7*. Os indivíduos 12, 14 e 16 não apresentaram a banda diagnóstica, e representam parte da amostragem coletada no Ribeirão Água da Madalena, os demais indivíduos (13, 15, 17 e 18) que apresentam a banda são do outro ponto de coleta, do Córrego Cascatinha

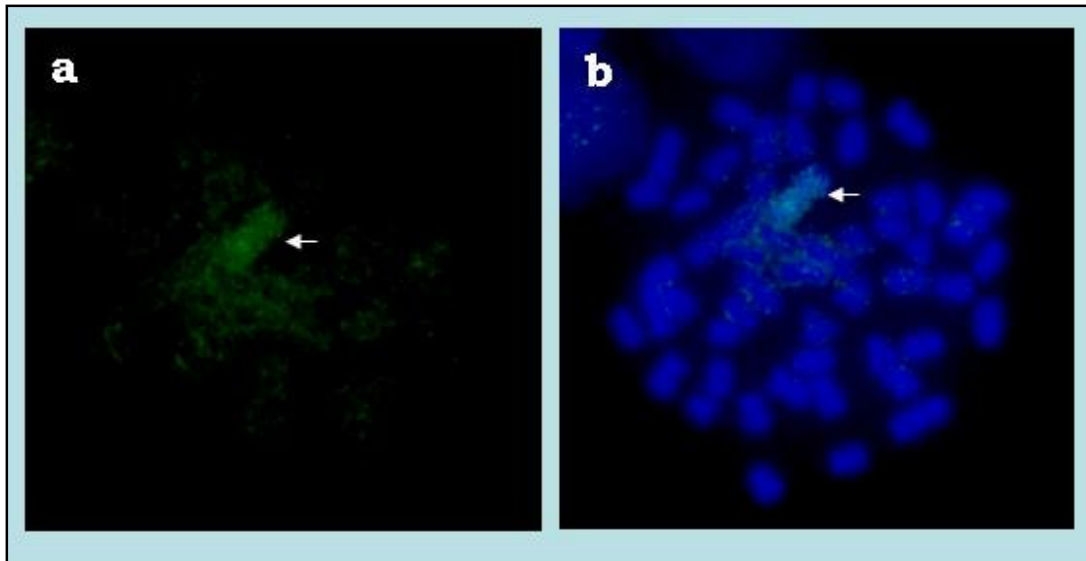


Figura. 6: Localização da sonda AsRI, obtida pela técnica de RAPD em metáfase somática de *Astyanax scabripinnis*. **a)** a seta indica a marcação da sonda AsRI detectado por avidina-FITC. **b)** metáfase capturada por fluorocromo DAPI-FITC e a seta indica cromossomo B marcado com a sonda AsRI.

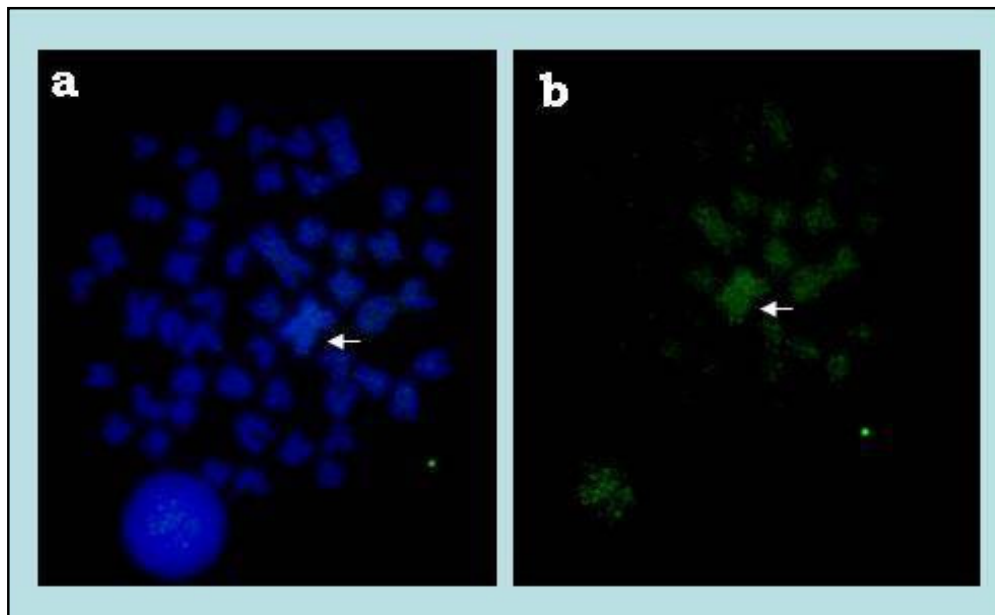


Figura. 7: Localização da sonda AsRVII, obtida pela técnica de RAPD em metáfase somática de *Astyanax scabripinnis*. **a)** a seta indica a marcação da sonda AsRVII detectado por avidina-FITC. **b)** metáfase capturada por fluorocromo DAPI-FITC e a seta indica cromossomo B marcado com a sonda AsRVII.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Beukeboom, L.M. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*, 73:328-336.
- Camacho, J. P. M. & Parker, J. (1993). *First B Chromosome Conference*. Miraflores de la Sierra, Madrid.
- Camacho, J.P.M. (2005). *B chromosomes*. In: Gregory, T.R. The evolution of the genome. San Diego, California, USA, p. 223-286.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. (1994). Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by in situ hybridisation. *Genome*, 37: 709-712.
- Donald, T.M.; Leach, C.R.; Clough, A.; Timmis, J.N. (1995). Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichrosomatica*. *Heredity*, 74: 55&-561.
- Eenennaam, A.L.; Eenennaam, J.P.V.; Medrano, J.F.; Doroshov, S.I. (1996). Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 147: 177-89.
- Eigenmann, C.H. (1921). The american characidae. *Memoirs of Museum Comparative Zoology*, 43: 227-310.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2005). Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genética*, 124: 301-306.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. p.220.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Gourmet, C. & Rayburn, L. (1996). Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. *Heredity*, 77: 240-244.
- Gutknecht, J.; Sperlich, D.; Bachmann, L. (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma*, 103: 539-544
- Jones, R.N. & Rees, H. (1982). *B chromosomes*. Academic Press, New York, 249 p.

- Kovács, B.; Egedi, S.; Bártfai, R.; Orbán, L. (2001). Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) *Genetica*, 110: 267-276.
- Lin, B.Y. & Chou, H.P. (1997). Physical mapping of four RAPDs in the B chromosome of maize. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 534-538.
- López-Léon, M.D.; Neves, N.; Schwarzacher, J.S.; Heslop-Harrison, J.S.; Hewitt, G.M.; Camacho, J.P.M. (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double fish technique. *Chromosome Research*, 2: 87-92.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Todedo, L.F. (1992). Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pices, Characiformes, characidae). *Genética*, 87: 101-106.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1994a). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Rev. Bras. Genet.*, 17: 153-156.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Molec. Biol.*, 21: 201-206.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2001). Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 110: 177-183.
- Martins, C. & Galetti Jr, P.M (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1-9.
- Moreira Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Rev. Brasil. Genet.*, 14: 331-358.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 230-234.
- Neo, D.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2000a). Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108: 211-215.

- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E.L.; Foresti, F (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 377-380.
- Qi, L.X.; Zeng, H.; Li, X.L. (2002). The molecular characterization of maize B chromosome specific AFLPs. *Cell. Res.*, 12: 63-68.
- Salvador, L.B. & Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69: 50-56.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schmid, M.; Ziegler, C.G.; Steinlein, C.; Nanda, I.; Scharl, M. (2006). Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research*, 14: 231-242.
- Silva, M.J.J. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1998). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.*, 6: 455-462.
- Stark, E.A.; Connerton, I; Bennet, S.T. (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Res.*, 4: 15-23.
- Stein, J.; Phillips, R.B.; Devlin, R.H. (2001). Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenetic and Cell Genetics*, 92: 108-110.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Stepien, C.A. & Kocher, T.D. (1997). Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Kocher, T.D.; Stepien, C.A.(eds.). *Molecular Systematics of fish*. New York: Academic Press. p.1-12.
- Tanic, N.; Dedovic, N.; Vujosevic, M.; Dimitrijevic, B. (2000). DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome Research*, 10: 55-61.
- Tosta, V.C.; Waldschmidt, A.M.; Brito, R.M.; Pompolo, S.G.; Salomão, T.M.F.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (1998). Marcadores RAPD ligados a Presença de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Genet. Moi. Biol.*, 21 (Suppl): 83.
- Tosta, V.C.; Waldschmidt, A.M.; Good-God, P.L.V.; Pompolo, S.G.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (1999). Uso de marcadores moleculares para o

estudo de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.*, 22 (Suppl): 182.

Tosta, V.C.; Fernandes-Salomao, T.M.; Tavares, M.G.; Pompolo, S.G.; Barros, E.G.; Campos, L.A. (2004). A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 106(2-4): 279-83.

Vieira, M.M.R. (2001). Análise da evolução de populações locais de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes, Characidae) da região de Botucatu com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. p128.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.

Wilkes, T.M.; Francki, M.G.; Langidge, P. (1995). Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, 3: 466-472.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

Ziegler, C.G.; Lamatsch, D.K.; Steinlein, C.; Engel, W.; Schartl, M.; Schmid, M. (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposons-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, 11: 23-35.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO EM *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) UTILIZANDO MICRODISSECAÇÃO CROMOSSÔMICA.

*Algo só é impossível até que alguém duvida
e acaba provando o contrário.
Albert Einstein*

RESUMO

Nos últimos 20 anos, várias informações têm sido acrescentadas, com diferentes tipos de abordagens, sobre as características dos cromossomos supranumerários (ou B) em peixes e em diversos grupos de organismos, com a finalidade de se entender a origem e possíveis funções desses elementos genômicos nos indivíduos que os possuem. A presença de cromossomos B em peixes não é um evento raro e sua ocorrência tem sido descrita em um grande número de espécies, principalmente da fauna neotropical. Porém, ainda são poucas as informações existentes sobre a origem e função desempenhada por estes enigmáticos segmentos genômicos. Estes cromossomos são adicionais e não homólogos aos do complemento padrão (A), podendo persistir na população em alta frequência, o que faz aumentar o interesse pelo seu estudo. Neste trabalho foi utilizada a espécie *Astyanax scabripinnis* que é portadora de um sistema formado pela presença de um macrocromossomo B, além dos cromossomos normais (complemento A) e representa um modelo interessante para estudos citogenéticos envolvendo aspectos da sua origem, estrutura e função. A partir de preparações cromossômicas de *Astyanax scabripinnis* ($2n=50 +1B$), capturados no córrego Cascatinha, pertencente à Bacia Hidrográfica do Tietê (SP), foram obtidas amostras do cromossomo B desta espécie, através da microdissecação cromossômica. Estas foram processadas por análise molecular, com amplificação por SCOMP, para obtenção de sondas provenientes de segmentos de DNA deste elemento genômico nos indivíduos desta população, o cromossomo B é geralmente de grande tamanho, do tipo metacêntrico e quando submetido ao bandeamento C, fica corado fracamente, de maneira homogênea, sugerindo ser este de um tipo “pseudo-heterocromático”. Uma sonda obtida foi hibridizada por microFISH em preparações cromossômicas dos mesmos indivíduos dos quais os cromossomos B foram microdissecados, revelando marcações conspícuas ao longo do cromossomo supranumerário, sugerindo aparente amplificação preferencial de algumas regiões desses cromossomos.

Palavra Chave: Characidae, microdissecação, Cromossomo B, microFISH

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a citogenética de peixes tem se desenvolvido de modo significativo, num salto expressivo de obtenção de informações com a introdução de novas técnicas para análise cromossômica. Assim, a construção de variações envolvendo tanto o número quanto a estrutura dos cromossomos dos peixes vem aumentando à medida que se ampliam os estudos citogenéticos nesses animais.

Segundo Almeida-Toledo *et al.* (2000) a variabilidade cromossômica em peixes neotropicais é extraordinária quanto ao número e fórmula cromossômica. Dentro do grupo de peixes representado pela espécie *Astyanax scabripinnis* encontra-se uma grande variabilidade cariotípica, reflexo de suas características ecológicas e genéticas, além de apresentar poliploidias naturais, polimorfismos em regiões organizadoras de nucléolos, padrões de bandeamentos heterocromáticos e eucromáticos e presença de cromossomos B, o que as tornam bastantes atrativas para os citogeneticistas (Moreira-Filho & Bertollo, 1991).

A presença de cromossomo supranumerário já foi descrita em indivíduos de 21 populações de *Astyanax scabripinnis* de várias localidades e de diferentes bacias hidrográficas, sendo que o macrocromossomo B metacêntrico está presente em 17 populações e o microcromossomo B mostrou-se exclusivos das outras quatro populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Por outro lado, as demais formas variantes como o macrocromossomo e o microcromossomo B submetacêntricos, foram encontradas somente nas populações provenientes da região de Campos do Jordão (Moreira-Filho *et al.*, 2004).

Segundo Moreira-Filho & Bertollo (1991), esta espécie de peixe tem sido considerada componente de um complexo de espécies, por apresentar esta grande diversidade morfológica e cariotípica, denominado de “complexo *scabripinnis*”, que apresenta uma grande distribuição geográfica, sendo predominante na América do Sul (Fernandes & Martins-Santos, 2005). Devido a essa grande variabilidade encontrada na espécie *Astyanax scabripinnis* é principalmente relacionada ao fato de alguns indivíduos e algumas populações serem portadoras de cromossomos B, fica evidente a

necessidade do desenvolvimento e da aplicação de novas metodologias voltadas ao estudo do cromossomo supranumerário, para auxiliar, associado à aplicação de técnicas convencionais e de alta resolução da citogenética, na compreensão dos mecanismos de especiação que atuaram e atuam neste grupo de organismos.

A microdissecação cromossômica é um método viável para o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo o estabelecimento de sondas para FISH, construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e o mapeamento físico para análise citogenética.

A técnica de microdissecação foi introduzida na citogenética e fornece um método direto de análise da estrutura e composição molecular dos cromossomos B. As informações obtidas por meio dessas análises são de grande interesse para o entendimento da possível função desses cromossomos no genoma de seus portadores (McQuade *et al.*, 1994). A técnica de microdissecação tem sido utilizada no estudo dos cromossomos B em vários grupos de animais como anfíbios (Sharbel *et al.*, 1998); salamandras (Brinkman *et al.*, 2000); roedores (Karamysheva *et al.*, 2002; Trifonov *et al.*, 2002; Rubtsov *et al.*, 2004) e marsupiais (McQuade *et al.*, 1994).

A utilização da metodologia de micro-FISH, associada à prática da microdissecação, na caracterização dos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* será uma ferramenta valiosa na obtenção de dados, para uma melhor compreensão da composição, estrutura e mecanismos envolvidos na origem e evolução desse tipo de cromossomos nessa espécie e, de uma forma geral, em peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

Cinco exemplares adultos de *Astyanax scabripinnis* coletados no córrego Cascatinha (Botucatu-SP) componente da bacia hidrográfica do rio Tietê, foram utilizados. Após a obtenção de preparações cromossômicas mitóticas verificou-se o número diplóide de $2n=51$ cromossomos em três indivíduos (2 fêmeas e 1 macho) devido à ocorrência de um macrocromossomo B em sua constituição cariotípica, dois indivíduos sem cromossomo supranumerário apresentaram $2n=50$ cromossomos (1 fêmeas e 1 macho). Os indivíduos portadores de cromossomos B foram usados para microdissecação cromossômica (Figura 1). O processamento do material e a microdissecação foram realizados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, em Botucatu, SP. Os exemplares utilizados na amostragem foram identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório. A análise molecular foi realizada no laboratório NEOGENE da Faculdade de Medicina, de Botucatu, dessa mesma instituição.

Processamento das amostras

Preparação Cromossômica para Microdissecação:

A análise citogenética foi realizada em células do tecido renal de *Astyanax scabripinnis*, seguindo a metodologia descrita por Foresti *et al.* (1993) e estocadas em freezer -20°C em suspensão em metanol para posterior utilização. A microdissecação dos cromossomos foi realizada com base na metodologia descrita por Hu *et al.* (1998). Os cromossomos supranumerários de *Astyanax scabripinnis* foram “raspados” de lamínulas, pingadas e coradas minutos antes da microdissecação. Para tal procedimento foram utilizadas microagulhas produzidas por alongamento “a quente” em puller (Narishige PC-10) de capilares de vidro com diâmetro de aproximadamente 0,5mm e outras do tipo Fentotip e Fentotip II adquiridas da Eppendorf, com diâmetros de 0,5mm e de 0,2mm, respectivamente. Estas

foram então fixadas no micromanipulador eletrônico, Joystick, TransferMan NK2 (Eppendorf), acoplado ao microscópio AXIOvert 100 (Zeiss). O material microdissecado foi colocado em tubos de Eppendorf (0,2ml) contendo 20µl de proteinase K (19ng/µl), sendo tratado em seguida a 37 °C por 2 horas como descrito por Zhang *et al.* (2005).

Amplificação, marcação e precipitação da sonda:

A primeira amplificação do DNA foi realizada utilizando o kit *GenomiPhi™* (Amersham Biosciences), seguindo a especificação do fabricante. Depois desta, foi realizada uma segunda amplificação por SCOMP “*single cell comparative genomic hybridization*”, técnica descrita por Stoecklein *et al.* (2002). Primeiramente realizou-se uma reação de digestão utilizando *Mse I digest solution* (BioLabs) e outra reação para a formação de adaptadores. Posteriormente, os produtos das reações foram unidos (o volume total da reação do adaptador foi adicionado ao tubo da digestão que continha as amostras), sendo incubado a 15°C *overnight* para a ligação dos adaptadores no DNA de interesse. Para a amplificação propriamente dita, acrescentou-se ao mesmo tubo 40µl do mix para a ligação de fragmentos genômicos, que foi então colocado no termociclador utilizando o programa com rampa e checado em gel de agarose 1%. Utilizou-se *Labeling PCR Mix* (Biotina e Digoxigenina, Roche) para a marcação da sonda obtida. Foram feitos dois tubos para obtenção de duas sondas diferentes, uma marcada com Biotina (verde) e outra marcada com Digoxigenina (vermelho) e ambos os tubos foram colocados no termo no programa indicado no kit. Logo após removeu-se o LIB1 de ambas as sondas, para checar em gel de agarose 1% e estocar no freezer (-20°C). Com a sonda obtida e marcada, foi possível realizar o microFISH. Ressuspendeu-se a sonda em 30µl de Hibridisol VII, sendo esta desnaturada por 10min em banho Maria a 75°C e incubada a 37°C por uma hora antes da hibridação.

Preparação da lâmina, hibridação e detecção:

O processo de hibridação em lâmina foi realizado segundo o seguinte protocolo: desidratar as lâminas em séries alcoólicas (70, 90 e

100%), por 5min cada. Tratar com Pepsina por 10min aquecida a 37°C. Transferir as lâminas para solução de tampão 1XPBS/MgCl₂ 50mM por a 37°C por 10min. Tratar com 2XSSC por 10min aquecida a 37°C. Desidratar as lâminas numa segunda série alcoólica. Desnaturar as lâminas em Formamida 70%/2XSSC a 70°C por 1min. Desidratar as lâminas numa terceira série alcoólica gelada, por 3min cada. O mesmo procedimento foi realizado para todas as lâminas utilizadas na aplicação da técnica de microFISH. Para a hibridação, foram colocados 15µl de sonda marcada com Biotina sobre uma lamínula e a lâmina tratada foi invertida sobre a mesma. A preparação foi selada com *rubber cement* para não ressecar e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a 37°C por 72 horas. Este mesmo procedimento foi realizado com as sondas marcadas com Digoxigenina. Para proceder à detecção, foram removidas a película de cola e a lamínula e lavada 2 vezes em formamida 50%/2XSSC a 37°C por 5min cada e 3 vezes em 2XSSC a 37°C por 5min cada. Colocou-se 20µl de BlockI com 20µl de TNB sobre a lamínula, inverteu-se a lâmina sobre a mesma e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 30 min. A seguir, a lamínula foi removida e preparou-se outra lamínula contendo o mix de detecção (40µl de FITC-avidina, para a lâmina com sonda marcada com Biotina e 5µl de anti-dig, para a de Digoxigenina), que foi incubada em câmara úmida a 37°C por 30min. A lamínula foi removida e a preparação lavada 3 vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. Adicionou-se em uma lamínula 40µl de anti-avidina, para a de Biotina e 5µl de *sheep-anti mouse*, para a de Digoxigenina e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 30min. Esta lamínula foi então removida e a preparação lavada 3 vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. Em outra lamínula foram adicionados 40µl de FITC-avidina, para a de Biotina e 10µl de Rodamina, para a Digoxigenina e a preparação foi novamente incubada em câmara úmida a 37°C por 30min. A lamínula removida e a preparação lavada 3 vezes com WASH-C a 37°C por 5min cada. Em uma nova lamínula foram adicionados 8µl de DAPI, para ambas as lâminas, que foram acondicionadas em freezer -20°C por no mínimo 24 horas.

Análise dos dados:

À medida que foram retirados das preparações cromossômicas nas lamínulas, os cromossomos B microdissecados dos indivíduos de *Astyanax scabripinnis*, foram distribuídos em 6 tubos Eppendorfs (0,2ml) contendo 20µl de proteinase K (19ng/µl) cada. Estes foram devidamente identificados e em seguida tratados a 37°C por 2 horas. A sonda foi obtida a partir de 8 cromossomos B microdissecados de apenas um indivíduo e amplificados por SCOMP, sendo denominada de AsMB. Esta foi marcada com Biotina e Digoxigenina, para ser utilizada nas hibridações realizadas. Para a hibridação foram utilizados os indivíduos com cromossomo B, sendo um deles o indivíduo do qual se obteve a sonda e outros sem cromossomos supranumerário, para ambas as sondas. Após três dias acondicionadas em freezer -20°C, as lâminas hibridizadas foram analisadas e fotodocumentadas no fotomicroscópio de fluorescência *BX61* (Olympus). As imagens foram capturadas através de um sistema de captura e análise de imagem (Applied spectral imaging, versão 4.0) do laboratório NEOGENE da Faculdade de Medicina, da UNESP-Botucatu e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O macrocromossomos B de *Astyanax scabripinnis*, coletados no córrego Cascatinha, é do tipo metacêntrico e equivalente em tamanho aos cromossomos do primeiro par nesta espécie e apresenta-se geralmente homogeneamente corado (inteiramente heterocromático) como já descritos anteriormente por vários autores para esta localidade (Maistro *et al.*, 1994a, Porto-Foresti *et al.*, 1997, Maistro *et al.*, 1998, Maistro *et al.*, 2001). Neste trabalho, os cromossomos B dos indivíduos coletados no Córrego Cascatinha que foram submetidos ao bandeamento C, também se apresentaram homogeneamente corados, porém com coloração mais clara do que as bandas heterocromáticas encontradas comumente nos cromossomos do complemento A (Figura 2), por esta razão foi nomeado de “pseudo-heterocromático”.

Conforme descrito anteriormente (Capítulo I), esta diferença apresentada poderia estar relacionada com a limitação proporcionada pelo processo realizado por filmes e ampliações manuais em papel Kodak, que determinaria a homogeneização do contraste nas fotos de bandas C, identificando com a mesma intensidade o cromossomo B e as regiões heterocromáticas dos cromossomos do complemento A. Isso pode ser sugerido pelo fato de neste trabalho as imagens terem sido capturadas no fotomicroscópio através de uma câmera digital DP70 (Olympus) e processadas pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*. Os cromossomos B, uma vez identificados nas preparações foram microdissecados e coletados com certa facilidade, devido a sua morfologia e tamanho quando comparado ao par (Figura 1) e transferidos para tubos de Eppendorf (0,2ml) contendo proteinase K (19ng/ μ l).

A técnica de microdissecação foi estabelecida desde 1981 e sua aplicação e desenvolvimento têm seguido o avanço da técnica de PCR. Ludecke *et al.* (1989) estabeleceu inicialmente a metodologia de amplificação de cromossomos microdissecados mediados por vetores. Posteriormente foram aplicadas outras metodologias para tal amplificação, como a técnica de DOP-PCR (*degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction*), utilizada pela maioria dos trabalhos anteriormente citados e a técnica de LA-PCR (*linker adaptor-mediated polymerase chain reaction*) utilizada por Zhang *et al.* (2005).

No estudo dos cromossomos B sua aplicação tem sido feita desde há algum tempo, principalmente na construção e caracterização de sondas específicas para estes cromossomos em vários organismos, como em cromossomos B de *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1995) de *Secale cereale* (Houben *et al.*, 1996) de *Alium schoenoprasum* (Bougourd *et al.*, 1997), de *Leipelma hochstetteri* (Sharbel *et al.*, 1998), de *Dicamptodon tenebrosus* (Brinkman *et al.*, 2000), de *Brachycome dichromosomatica* (Houben *et al.*, 2001), de *Apodemos peninsulares* (Karamysheva *et al.*, 2002 e Trifonov *et al.*, 2002), de *Nyctereutes procyonoides* (Trifonov *et al.*, 2002), de *Zea mays* (Cheng *et al.*, 2003), de *triticum aestivum* (Zhang *et al.*, 2005), entre outras.

No presente trabalho foi utilizada a técnica de SCOMP para amplificar os cromossomos B microdissecados, técnica esta bastante utilizada para amplificar DNA de célula cancerosa microdissecada de tecido parafinado e de DNA em pequenas quantidades (Stoecklein *et al.*, 2002). Este é o primeiro trabalho a utilizar esta técnica para tal finalidade, em peixes, pela sua similaridade com a técnica LA-PCR, que também utiliza adaptadores baseados na técnica RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*), reduzindo significativamente a contaminação devido à ligação de adaptadores com a dupla fita de DNA do cromossomo microdissecado, mantendo sua qualidade e resultado em baixa possibilidade de hibridações inespecíficas ou “*backgrounds*” (Figura 3).

A sonda AsMB foi obtida através da microdissecação do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, amplificada e marcada com Biotina e Digoxigenina pela técnica de SCOMP, sendo checada em gel de agarose, como mostra a Figura 3. As estringências de ambas as bandas obtidas foram bastante similares, mostrando a eficiência da técnica. Porém, não foi possível clonar a sonda devido à pequena quantidade de cromossomos microdissecados, e ainda frente à grande dificuldade de padronização da técnica.

A sonda obtida foi hibridizada por microFISH em preparações cromossômicas dos mesmos indivíduos dos quais os cromossomos B foram microdissecados. Também foi realizada hibridação da sonda em preparações mitóticas de indivíduos sem cromossomos supranumerário. Após três dias acondicionadas em freezer -20°C, as lâminas hibridizadas foram analisadas e fotodocumentadas (Figura 4). A sonda ligada tanto à Biotina quanto à Digoxigenina hibridou com regiões dos cromossomos B de todos os indivíduos portadores de cromossomos supranumerário, não sendo observada nenhuma marcação nos cromossomos do complemento A dos indivíduos com e sem cromossomos B. Nestes cromossomos as marcações revelaram-se, contudo conspícuas ao longo do cromossomo supranumerário, sugerindo aparente amplificação preferencial de algumas regiões desses cromossomos. Marcações da sonda também puderam ser visualizadas nos

núcleos interfásicos, mostrando o posicionamento do cromossomo B nesta fase, reforçando a viabilidade da técnica (Figura 4).

Este mesmo resultado foi encontrado em *Triticum aestivum* (Zhang *et al.*, 2005), onde através da microdissecação foram produzidas sondas específicas para cromossomos B, e hibridam nas preparações apenas nestes cromossomos, reforçando a hipótese de que os cromossomos B evoluíram independentemente, a partir de diferentes formas de origem, consideradas tanto intra quanto interespecíficas. Vários trabalhos realizados a partir da década de 90 utilizando técnicas de genética e citogenética molecular permitiram identificar seqüências específicas dos cromossomos B. Estas seqüências são em geral responsáveis pela heterocromatinização dos cromossomos B após a sua origem, sendo ricas em adenina e timina e em geral, apresentam seqüências repetitivas (Jones, 1995). Contudo, algumas sondas produzidas a partir de cromossomos B microdissecados apresentaram homologia com alguns cromossomos do complemento A, sugerindo uma origem intraespecífica, como em *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1995), em *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel *et al.*, 1998), entre outros.

Considera-se, pois, que a hibridação desta sonda em indivíduos principalmente de outras populações de *Astyanax scabripinnis* que apresentam cromossomo B poderá contribuir com novas informações que deverão ser úteis para a identificação da estrutura molecular destes elementos genômicos e gerar subsídios para a compreensão dos mecanismos de origem e evolução dos cromossomos supranumerários nesta espécie e, por conseguinte, nos peixes.

FIGURAS

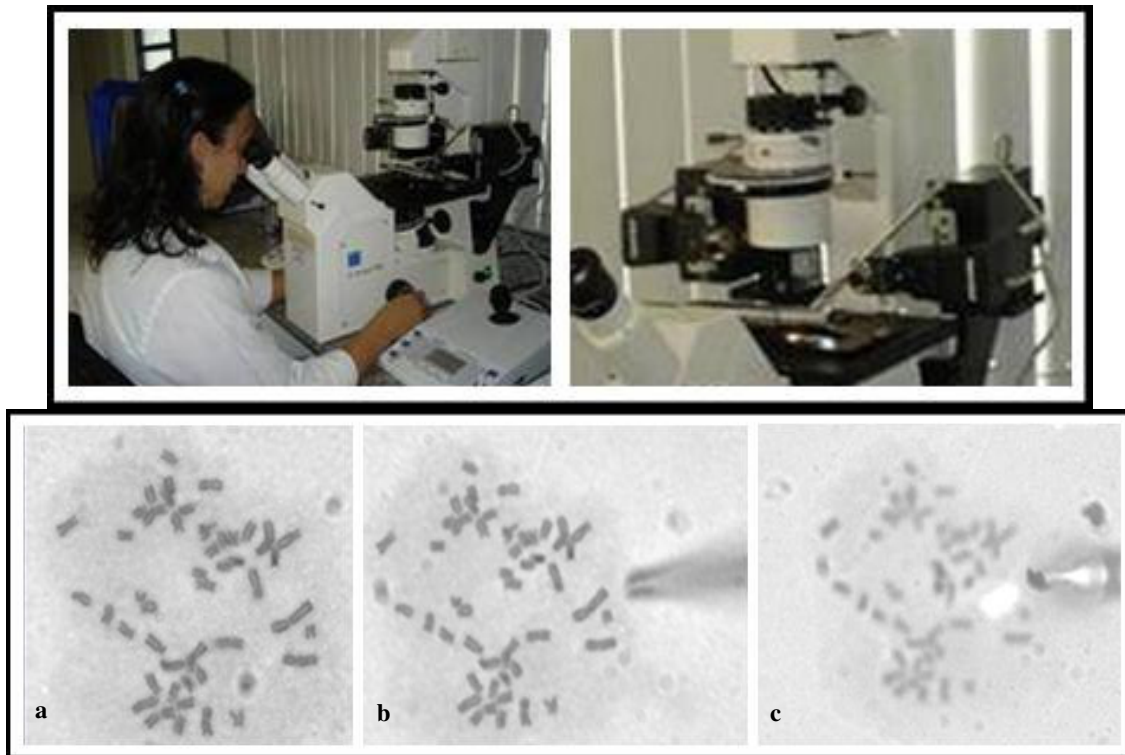


Figura. 1: Micromanipulador eletrônico (Joystick, TransferMan NK2, Eppendorf) acoplado ao microscópio invertido AXIOvert 100 (Zeiss) utilizado para microdissecação cromossômica. Ilustração do processo de microdissecação cromossômica, realizado em metáfases somáticas de *Astyanax scabripinnis*. **a)** metáfase somática de *Astyanax scabripinnis*; **b)** microagulha e cromossomo B em posição de captura; **c)** raspagem e captura do cromossomo B, mostrado na ponta da microagulha.

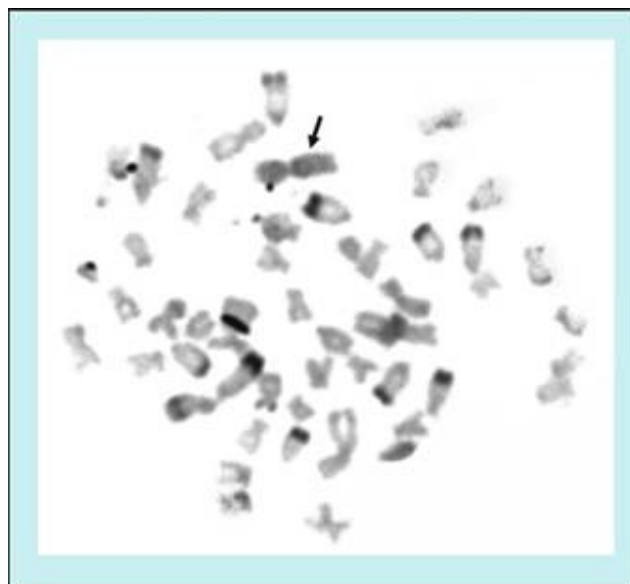


Figura 2: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* ($2n=51$) submetida ao tratamento com hidróxido de Bário (Banda C) evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Indivíduo coletado córrego Cascatinha (Botucatu-SP). A seta indica o cromossomo supranumerário identificado pelo seu tamanho e caracter “pseudo-heterocromático”.

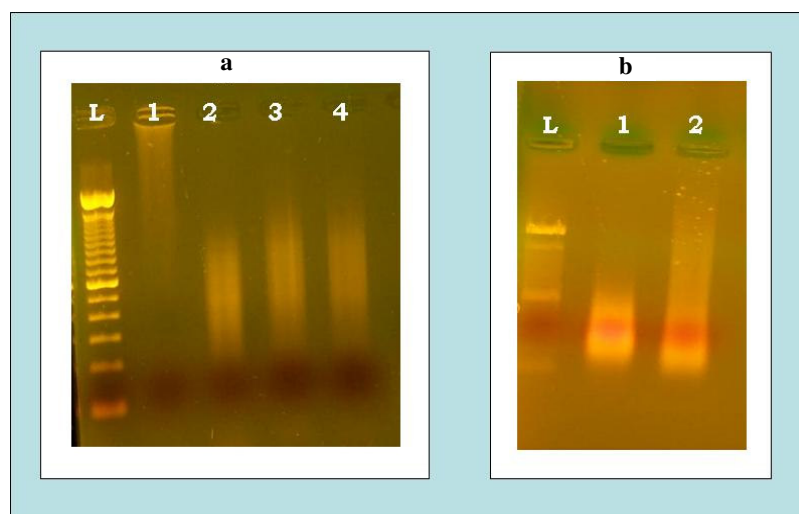


Figura. 3: Amplificações de DNA do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis* obtidas pela técnica de SCOMP. **a)** Gel mostrando o DNA amplificado depois da ligação dos adaptadores (**L**: 100pb DNA Ladder (invitrogen), **1**: amostra não amplificada **2 a 4**: amostras amplificadas, pela técnica de SCOMP, do mesmo indivíduo) **b)** Gel das sondas marcadas prontas para serem hibridizadas (**L**: 100pb DNA Ladder (invitrogen), **1**: sonda marcada com Biotina e **2**: sonda marcada com Digoxigenina).

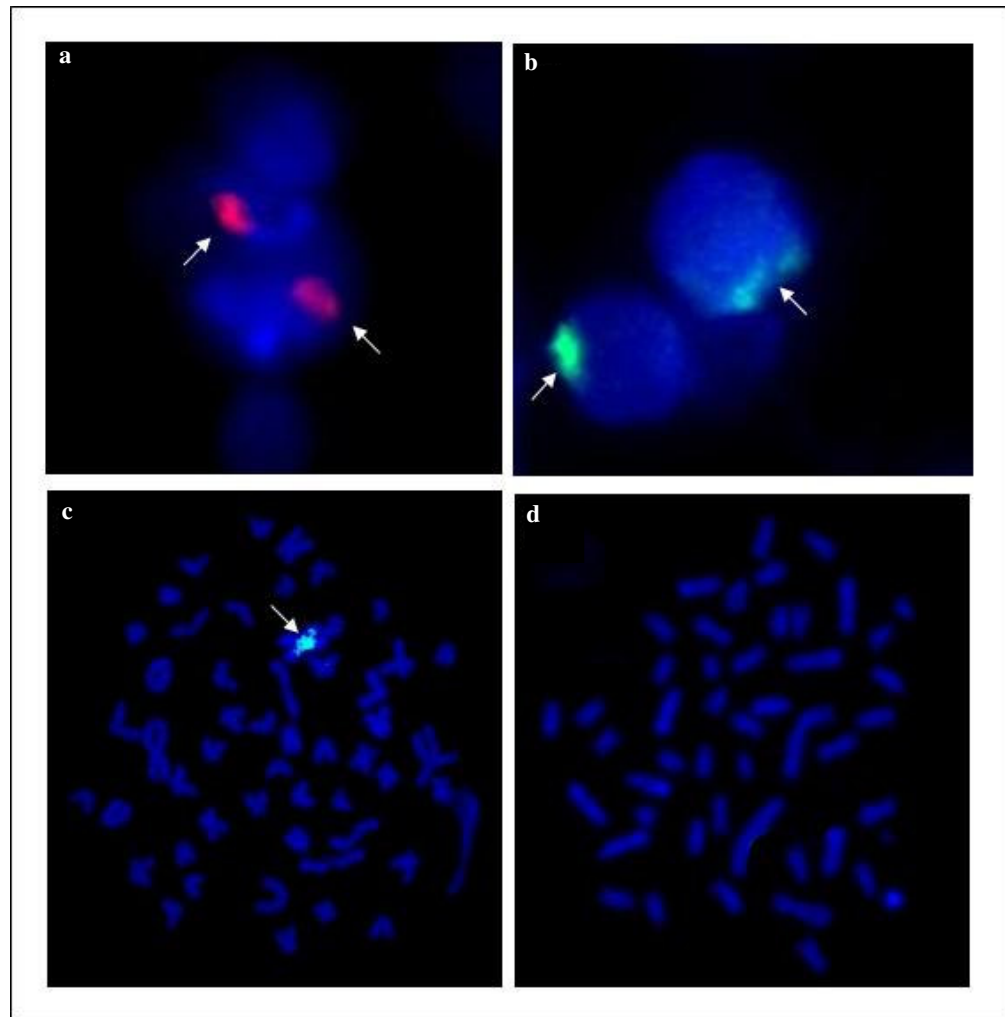


Figura 4: Hibridação *in situ* fluorescente (microFISH) em núcleos interfásicos e em cromossomos metafásicos de *Astyanax scabripinnis* para localização da sonda AsMB obtida pela microdissecação cromossômica B-específica. a) A seta indica a marcação da sonda AsMB, marcada com Digoxigenina, no cromossomo supranumerário de células interfásica; b) A seta indica a marcação da sonda AsMB, marcada com Biotina, no cromossomo supranumerário de células interfásica; c) a seta indica marcação de região com a sonda marcada com Biotina; d) ausência de marcação nos cromossomos do complemento A, em metáfase de indivíduo sem cromossomo B

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Almeida-Toledo, L.F.; Daniel-Silva, M.F.Z.; Lopes, C.E.; Toledo-Filho, S.A. (2000). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Research*, 8:335-340.
- Brinkman, J.N.; Sessions, S.K.; Houben, A.; Green, D.M. (2000). Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 88: 124-129.
- Bougourd, S.M. & Jones, R.N. (1997). B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytol*, 137: 43-54.
- Cheng, Y.M., Lin, B.Y. (2003). Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*, 164: 299-310.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2005). Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genética*, 124: 301-306.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Houben, A.; Kynast, R.G.; Heim, U. (1996). Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 105: 97-103.
- Houben, A.; Field, B.L.; Saunders, V.A. (2001). Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. *Methods in Cell Science*, 23: 115-124.
- Hu, L.; Sham, J.S.; Tjia, W.M.; Tan, Y.Q.; Lu, G.X.; Guan, X.Y. (2004). Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. *Genomics*, 83(2):298-302.
- Jamilena, M.; Garrido-Ramos, M.; Rejón, M.R.; Rejón, C.R.; Parker, J.S. (1995). Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaries*. *Chromosoma*, 104: 113-120.
- Jones, R.N. (1995). B chromosomes in plants. Transley Review N°. 85. *New Phytologist*, 131: 411-434.

- Karamysheva, T.V.; Andreenkova, O.V.; Bochkaerev, M.N.; Borissov, Y.M.; Bogdanchikova, N.; Borodin, P.M.; Rubtsov, N.B. (2002). B chromosomes of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. *Cytogenet. Genome Res.*, 96: 154-160.
- Klein, C.A.; Schmidt-Kittler, O.; Schardt, J.A.; Pantel, K.; Speicher, M.R.; Riethmuller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(8): 4494-9.
- Ludecke, H.J.; Senger, G.; Claussen, U.; Horsthemke, B. (1989). Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 338: 348-350.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1994a). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Rev. Bras. Genet.*, 17: 153-156.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Molec. Biol.*, 21: 201-206.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2001). Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 110: 177-183.
- McQuade, L.R.; Hill, R.J.; Francis, D. (1994). B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae). *Cytogenet. Cell Genet.*, 66: 155-161.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Rev. Brasil. Genet.*, 14: 331-358.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 230-234
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E.L.; Foresti, F. (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 377-380.
- Rubtsov, N.B.; Karamysheva, T.V.; Andreenkova, O.V.; Bochkaerev, M.N.; Kartavtseva, I.V.; Roslik, G.V.; Borissov, Y.M. (2004). 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.*, 106: 289-294.

Sharbel, T.F.; Green, D.M.; Houben, A. (1998). B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome*, 41: 14-22

Stoecklein, N.H.; Erbersdobler, A.; Schmidt-Kittler, O.; Diebold, J.; Schardt, J.A.; Izbicki, J.R.; Klein, C.A. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am. J. Pathol.*, 161(1): 43-51.

Trifonov, V.A.; Perelman, P.L.; Kawada, S.I.; Iwasa, M.A.; Oda, S.I.; Graphodatsky, A.S. (2002). Complex structure B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonides* (Carnivora). *Chrom. Res.*, 10: 109-116.

Zhang, F.Y.; Yin, W.B.; Shi, R.; Hu, Y.K.; Yan, Y.M.; Chen, Y.H.; Zhou, Y.H.; Hu, J., Wang, R.R.C.; Hu, Z.M. (2005). Construction and characterization of chromosome 1B specific DNA library of wheat. *Can. J. Plant. Sci.*, 85: 309-316.

CAPÍTULO III

MAPEAMENTO DE SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA EM CROMOSSOMOS B DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

*Faça as coisas o mais simples que você puder,
porém não as mais simples.
Albert Einstein*

RESUMO

Os cromossomos supranumerários representam elementos genômicos peculiares de alta heterogeneidade e desde a sua descoberta, têm atraído interesse dos citogeneticistas, por serem dispensáveis, de origem e função misteriosa e possuírem ampla ocorrência, estando presentes em alguns indivíduos de algumas populações de diferentes grupos de animais e plantas. Para melhor entender a estrutura final dos cromossomos moldados pelos processos de evolução molecular e melhor caracterizar as seqüências repetitivas inseridas nos cromossomos supranumerários de *Astyanax scabripinnis*, o DNA dos indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B de exemplares capturados no córrego Cascatinha bacia do rio Tietê e do Ribeirão Água da Madalena da bacia do rio Paranapanema, foram submetidos à fragmentação em autoclave para posterior subclonagem. Dos clones obtidos, apenas um, escolhido aleatoriamente, nomeado de B34 α , foi caracterizado. A localização cromossômica dessa sonda por FISH mostrou-se nitidamente presente em vários cromossomos do complemento A similares aos padrões obtidos pelo bandeamento C, em ambas as populações, além de uma marcação intersticial somente no cromossomo B dos indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena. Contudo, não foi observado este mesmo padrão e nenhum outro tipo de marcação nos cromossomos do complemento A de indivíduos não portadores de cromossomos B para ambas as populações. A ausência deste tipo de marcação em indivíduos não portadores de cromossomos B pode estar relacionada com a organização destas seqüências repetitivas, pelo fato destas serem seqüências pequenas e dispersas dificultando sua detecção pela técnica utilizada ou do processo de origem dos cromossomos B, sugerindo um possível efeito dos cromossomos B sobre o genoma desta espécie. Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese da ausência dessas seqüências nos indivíduos sem cromossomos B. Os resultados obtidos acrescentam informações sobre o processo de diversificação cromossômica em *Astyanax scabripinnis*, bem como sobre os mecanismos relacionados à origem e dos cromossomos B nesta espécie.

INTRODUÇÃO

Os cromossomos B representam elementos genômicos peculiares de alta heterogeneidade e desde a sua descoberta, este tipo de cromossomo tem chamado a atenção dos citogeneticistas por serem dispensáveis, de origem e função misteriosa e serem de ampla distribuição entre diferentes grupos de organismos. A distribuição geográfica dos indivíduos portadores do B pode estar relacionada a fatores históricos e ecológicos (Camacho, 1993).

A ocorrência de cromossomos B dentro de uma população pode ser esporádica ou comumente encontrada para muitas espécies. Pode mostrar uma alta freqüência entre os indivíduos e exibir variações em relação à morfologia, tamanho e número nos indivíduos portadores (Cavallaro *et al.*, 2000). A estabilização da freqüência de cromossomos B pode ser o resultado de uma seleção dirigida balanceada e o aumento da sua freqüência estar relacionado com a eliminação seletiva de indivíduos com altos números de cromossomos B (Cavallaro *et al.*, 2000), mas, a densidade populacional não parece estar relacionada com a freqüência dos cromossomos B (Porto-Foresti *et al.*, 1997).

Uma característica interessante destes cromossomos é seu caractere heterocromático. Jones (1995) salienta que eles são geralmente heterocromáticos e que a variação da heterocromatina constitutiva nos cromossomos B é muito maior que no complemento normal. Segundo Kavalco (submetido à publicação), a heterocromatina constitutiva corresponde a regiões repetitivas do genoma que permanecem extremamente conservadas durante todo o ciclo celular, previamente considerada como região não transcricional.

Os padrões de distribuição da heterocromatina no cariótipo das espécies têm proporcionado a iniciação de importantes estudos sobre o processo de diversificação de alguns grupos de peixes, como no gênero *Brycon* (Margarido & Galetti Jr., 1999) e *Leporinus* (Galetti Jr., 1998; Molina *et al.*, 1998; Margarido & Galetti Jr., 2000), onde a macroestrutura cariotípica é relativamente constante, mas com diferenciação entre espécies (Galetti Jr., 1991). Na espécie *Astyanax scabripinnis*, o padrão de

distribuição da heterocromatina tem sido também eficiente na identificação de polimorfismo cromossômico em algumas populações (Mantovani *et al.*, 2000), bem como na caracterização de cromossomos supranumerários. Mestriner *et al.* (2000) foram os primeiros autores a descreverem a composição estrutural e genética do DNA de cromossomo B nesta espécie.

Segundo Summer (1990), devido ao bandeamento C não revelar o conteúdo de bases nitrogenadas e a composição da heterocromatina, que pode ser variável, outras técnicas são necessárias para estudar a sua composição. Desta forma, o presente trabalho propõe estudos de seqüências repetitivas como alternativa para melhor compreender a estrutura final dos cromossomos moldados pelos processos de evolução molecular e melhor caracterizar a composição da heterocromatina constitutiva existente nos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis*.

O mapeamento cromossômico de seqüências de DNA é uma metodologia eficiente para auxiliar no esclarecimento da organização de seqüências repetitivas no genoma das espécies. Além disso, a integração de mapas cromossômicos a outros mapas físicos e de ligação representa a melhor estratégia para compreensão da estrutura e evolução dos genomas (Martins, 2005). Assim, a integração dos dados de seqüenciamento e mapeamento cromossômico podem promover um incremento no conhecimento dos elementos repetitivos inseridos nos cromossomos supranumerários. Além de poderem ser utilizados como marcadores cromossômicos, estudos de identificação e localização destes segmentos genômicos podem contribuir para a compreensão da estrutura cromossômica, bem como dos mecanismos envolvidos no processo de diversificação e evolução neste grupo de vertebrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

Foram utilizados neste trabalho, 6 exemplares adultos (3 fêmeas e 3 machos) de *Astyanax scabripinnis* capturados no córrego Cascatinha (Botucatu-SP), componente da bacia hidrográfica do rio Tietê. A análise citogenética revelou que três indivíduos apresentaram $2n=50$ cromossomos e os outros três indivíduos $2n=51$, devido à ocorrência de um macrocromossomo supranumerário em sua constituição cariotípica. Entre os 6 indivíduos (3 fêmeas e 3 machos) capturados no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP) componente da bacia hidrográfica do rio Pardo (afluente do rio Paranapanema), três apresentaram número diplóide de $2n=46$ e três $2n=47$, também devido à presença de um macrocromossomo supranumerário. O processamento do material e sua análise molecular foram realizados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, em Botucatu, SP. Os exemplares utilizados na amostragem foram identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório.

Processamento das amostras

Preparação Cromossômica e extração do DNA total:

A análise citogenética foi realizada em células renais, seguindo a metodologia descrita por Foresti *et al.* (1993) e o bandeamento C segundo Sumner (1972). O DNA total desses indivíduos foi extraído de fragmentos de tecidos provenientes do fígado ou de músculo, seguindo a metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações.

Obtenção e clonagem de DNA repetitivo:

Este procedimento está baseado na técnica de C_{ot} -1 (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas), o qual está fundamentado na cinética de reassociação do DNA (Zwick *et al.*, 1997). O procedimento consiste em colocar 500 μ l de DNA genômico (100-500ng/ μ l

diluído em 0,3M NaCl), em um tubo de 1,5ml e autoclavar por 30min a 1.4atm/120°C. checar o tamanho dos fragmentos obtidos em gel de agarose 1%%. Fazer três alíquotas desse DNA autoclavado de 50µl cada e desnaturá-los a 95°C por 10min. Passar imediatamente os tubos para o gelo e tratar o tubo 0 com S1 nuclease (acrescentar ao tubo 1U da enzima para 1µg de DNA, 5,5µl de tampão 10X para o volume final de 50µl e incubar a 37°C por 8min e congelar imediatamente em nitrogênio líquido) e os demais tubos permanecem no gelo por 10seg. Colocar os tubos 1 e 5 em banho 65°C para renaturação. Após um minuto, retirar o tubo 1 e proceder ao tratamento com S1 nuclease e após 5min, retirar o tubo 5 para o mesmo tratamento. Adicionar o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugar por 5min a 13.000rpm. Coletar somente a fase aquosa e passar para um tubo novo, devidamente numerado, precipitar o DNA com 2,5volumes de etanol absoluto gelado e deixar no freezer -70°C por 30min. Centrifugar por 15min a 15.000rpm a 4°C, secar e ressuspender em 50µl de água MilliQ. Para a clonagem dos fragmentos obtidos, foi utilizado 1µl do DNA renaturado para a ligação, no qual se utilizou o kit de ligação *pMOS Blue Blunt Ended Cloning Kit* (Amersham biosciences) e os produtos da ligações inserto-plasmídeo, identificados através de PCR, foram posteriormente utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies) e o restante dos clones de interesse foram estocados -70°C em glicerol 15%.

Isolamento do DNA repetitivo:

Os clones obtidos foram purificados através de ações de mini-preparações, a qual se refere à técnica de lise alcalina descrita em Sambrook & Russell (2001), conforme discriminado a seguir. Inicialmente, deve-se manter os tubos contendo as bactérias recombinantes em meio líquido a 37°C durante 12-16 horas, sob agitação a 225rpm. Centrifugar a 3.000rpm por 10min a 4°C e desprezar o sobrenadante. Ressuspender o *pellet* em 100µl de solução 1 (50mM tris-HCl pH8; 10mM EDTA pH8; 10µg/ml de RNase). Adicionar 110µl da solução 2 (SDS 1%; 200mM NaOH) e cuidadosamente rotacionar os tubos cerca de 20 vezes. Acrescentar 110µl da

solução 3 (Acetato de Potássio 3M, pH5,5) e rotacionar 15 vezes e deixar a 4°C por 10min. Centrifugar a 6.000rpm por 15min. Passar o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 2 volumes de etanol 100% gelado, inverter os tubos 20 vezes e colocar no freezer -70°C por uma hora. Centrifugar a 6.000rpm por 10min a 4°C e descartar o sobrenadante. Adicionar 200µl de etanol 70% gelado e centrifugar a 6.000rpm por 3min a 4°C, desprezar o sobrenadante, secar a 42°C por 15 min e ressuspender em 30µl de água MilliQ.

Seqüenciamento nucleotídico:

Os fragmentos de DNA de interesse clonados foram seqüenciados automaticamente para determinação de sua seqüência nucleotídicas. Para esta metodologia foi utilizado o *DYEnamic ET terminator cycle sequencing Kit* (Amersham Biosciences) e seqüenciamento das amostras de DNA foi realizado automaticamente, no seqüenciador ABI 377, seguindo as especificações do fabricante. As seqüências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas Blastn (Altschul *et al.* 1990) e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), através do “website” (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) e o alinhamento final das seqüências consenso foi realizado manualmente.

Hibridação in situ Fluorescente (FISH):

As hibridações *in situ* foram realizadas segundo Martins & Galetti (2001), com algumas modificações. Inicialmente, os DNAs dos clones foram marcados com o Kit *BioNick™ Labeling System* (Invitrogen), seguindo-se as especificações do fabricante. A sonda foi preparada e desnaturada a 95°C por 5min e passada ao gelo imediatamente. Utilizaram-se lâminas recém preparadas e lâminas pingadas guardadas em freezer (-20°C). Nenhum pré-tratamento foi necessário. O DNA cromossômico foi desnaturado por 2min em formamida 70% a 67°C e então desidratada em série alcoólica gelada (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada. Foram acrescentados 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina contendo o material sobre a mesma. Manter as lâminas com o

material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C por dois dias. Remover a lamínula e Lavar em 2xSSC, pH=7,0 a 72°C, em banho sem agitação, por 5 minutos. Transferir para PBD a temperatura ambiente para proceder à detecção. A detecção e amplificação do sinal de hibridação foram feitas com Fluoresceína-avidina conjugada (FITC) e anti-avidina biotinilada. A lâmina foi contra-corada com DAPI e Guardada a -20°C por 3 dias antes da análise.

Análise dos dados:

O DNA dos 12 indivíduos (6 exemplares de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cascatinha e 6 indivíduos no Ribeirão Água da Madalena, sendo três indivíduos com cromossomo B e três sem cromossomo supranumerário, de ambas as localidades) foram autoclavados e submetidos à reação de desnaturação/reassociação e posterior tratamento com S1 nuclese (enzima que degrada DNA de fita simples). Após a verificação da realidade do DNA em gel, foi utilizada uma alíquota de DNA renaturado para ligar a vetores, obtendo-se 49 clones positivos. Pra verificar se os clones positivos realmente possuíam o fragmento inserido, realizou-se uma reação de PCR das colônias brancas, que comprovou a presença do fragmento referente ao tamanho desejado em 30 dos 49 clones positivos, desta forma a verificação dos clones positivos se torna necessário. Devido à presença de fragmentos muito pequenos de DNA, que por serem menores podem acabar se ligando ao plasmídeo mais facilmente. Os 30 clones foram isolados a partir de mini-preparações, nas quais foram isolados 16 clones com êxito. De um clone escolhido aleatoriamente foi produzida uma sonda, que foi caracterizada e nomeada de *AsB34a*, para ser hibridizada em cromossomos metafásicos de *Astyanax scabripinnis*. Foram realizadas três hibridações de quatro indivíduos por vez sempre utilizando lâminas de dois indivíduos de cada população, sendo um com e outro sem cromossomo B, ou seja, quatro lâminas para cada hibridação. Após três dias acondicionados em freezer a -20°C, as lâminas hibridizadas foram analisadas e fotodocumentadas no fotomicroscópio de fluorescência *BX61* (Olympus). As imagens foram capturadas através de uma câmera digital *DP70* (Olympus) e processadas

pelo programa computacional *Adobe Photoshop 7.0*. As seqüências nucleotídicas obtidas a partir do clone escolhido aleatoriamente, foram primeiramente submetidas a buscas Blastn (Altschul *et al.* 1990) e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), através do “website” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e o alinhamento final das seqüências consenso foi realizado manualmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando obter seqüências repetitivas de DNA e localizar sua presença nos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* e também para testar uma nova metodologia, foi realizado o procedimento denominado de C_0t-1 (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas), baseado na cinética de reassociação do DNA (Zwick *et al.*, 1997). Cinética de reassociação é um termo utilizado para medir a velocidade com a qual moléculas de fita simples complementares são capazes de se encontrar e formar dúpliques. O DNA é clivado e desnaturado em alta temperatura para gerar fragmentos de cerca de 100-1000pb. Após isso o DNA é renaturado, mas a freqüência de reassociação depende não apenas do tempo (t), mas também da concentração inicial (C_0) de uma dada seqüência, isto é, o valor de C_0t (Strachan & Read, 2002). Como as seqüências repetitivas geralmente têm grande número de cópias, elas se reassociam mais rapidamente do que as seqüências de poucas cópias ou de cópias únicas (Martins, 2005). O C_0t-1 DNA geralmente é utilizado como bloqueador em hibridações *in situ* quando se objetiva detectar seqüências com um número reduzido de cópias ou de cópias únicas, principalmente quando se utiliza como sonda grandes seqüências inseridas em vetores YACs (*Yeast artificial chromosomes*) ou BACs (*Bacterial artificial chromosomes*) (Zwick *et al.*, 1997).

Amostras de DNA dos indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B de ambas as localidades foram submetidas ao processo de fragmentação em autoclave e à reação de desnaturação/reassociação para posterior subclonagem. A autoclavagem do DNA dos indivíduos envolvidos não apresentou diferenças em relação em a sua fragmentação, tanto no

material proveniente dos indivíduos portadores como naqueles não portadores de cromossomos B (Figura 1). Amostras de DNA provenientes de outros indivíduos portadores de cromossomo B foram autoclavados posteriormente, produzindo fragmentos de tamanhos bastante variados até no mínimo de 100pb (Figura 1). Este método permite que todo o DNA seja fragmentado, o que torna mais fácil a subclonagem de seqüências e permite uma melhor seleção dos fragmentos de DNA repetitivo, já que os mesmos, por terem mais cópias, se reassociam mais rapidamente. Através desta metodologia tornou-se possível a subclonagem de outras seqüências repetitivas, além daquelas obtidas através da técnica de RAPD (Capítulo I).

Dos 30 clones obtidos do DNA autoclavado dos indivíduos com cromossomo B de ambas as localidades, 16 foram isolados e purificados através de ações de mini-preparações com êxito (Figura 2). Porém, apenas um clone, selecionado aleatoriamente, nomeado de B34 α , que foi obtido através da autoclavagem e subclonagem do DNA de um indivíduo do córrego Cascatinha com cromossomo B foi seqüenciado (Figura 3). Quando comparado aos dados disponíveis no GenBank ficou confirmada a presença de seqüências repetitivas neste clone. As seqüências obtidas desse clone foram submetidas a buscas Blastn (Altschul *et al.*, 1990) e foram alinhadas automaticamente utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), através do “website” (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) O alinhamento final das seqüências consenso foi realizado manualmente. A análise da seqüência consenso desse clone revelou similaridade a um trecho da seqüência obtida pela digestão com a enzima *KpnI*, posteriormente denominada As51, publicada por Mestriner *et al.* (2000), também relacionada com o cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*.

A hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda AsB34 α , possibilitou identificar a localização dessas seqüências de DNA repetitivos e como elas estão organizadas nos cromossomos metafásicos de *Astyanax scabripinnis*. Para os indivíduos da população do córrego Cascatinha, portadores de cromossomos B, com a hibridação desta sonda foi possível observar marcações nítidas em vários cromossomos do complemento A similares aos obtidos pelo bandeamento C, padrão este já obtido

anteriormente por outros pesquisadores (Maistro *et al.*, 1998a). Porém, nenhuma marcação foi evidenciada no cromossomo B desses indivíduos. Aparentemente, tal seqüência de DNA repetitivo não estaria na composição seqüencial do DNA do cromossomo supranumerário dos indivíduos portadores desta população (Figura 3a).

Nos indivíduos portadores de cromossomos B da população do Ribeirão Água da Madalena também foram obtidas marcações bastante evidentes nos cromossomos do complemento A, similares aos padrões obtidos pelo bandeamento C, padrão esse já identificado anteriormente por outros pesquisadores (Maistro *et al.*, 1998a; Vieira, 2001), além de uma marcação intersticial no cromossomo B desses indivíduos (Figura 3c e d). Contudo, não foi possível observar este mesmo padrão e nenhum outro tipo de marcação nos cromossomos do complemento A, nos indivíduos não portadores de cromossomos B para ambas as populações (Figura 4). Foi possível observar apenas o padrão semelhante de bandeamento G, obtido pela coloração por DAPI, possivelmente identificando regiões ricas em AT (Lin *et al.*, 1977). Verifica-se, pois, a presença de um segmento de DNA repetitivo do tipo da sonda utilizada no cromossomo B dos indivíduos portadores desta população.

A ausência deste tipo de marcação em indivíduos não portadores de cromossomos B poderia estar relacionada com a organização destas seqüências repetitivas, que poderiam ser curtas e dispersas nos cromossomos, o que dificultaria sua observação por esta técnica. Desta forma, as seqüências de bases repetidas contidas na sonda AsB34a poderiam ser insuficientes para sua detecção por DAPI-FITC, como já descritos por Comings & Drets, 1976; Comings, 1978; Johnston *et al.*, 1978), além do fato já mencionado, relacionado à organização estrutural das seqüências heterocromáticas nos cromossomos (Saitoh & Laemmli, 1994).

É importante salientar que a alta diversidade cariotípica encontrada em *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2004; Moreira-Filho *et al.*, 2004), além da diversidade encontrada ao nível microestrutural (Abel *et al.*, 2006), revela que a aplicação de estudos envolvendo a combinação de

diferentes técnicas deveria ser valorizada na investigação qualitativa da heterocromatina constitutiva em peixes.

Atualmente, algumas hipóteses tentam explicar a origem e os processos evolutivos que envolvem a presença dos cromossomos supranumerários em representantes de grande número de grupos biológicos. Algumas propõem processos de evolução independente desses cromossomos B no genoma de seus organismos portadores. Segundo Camacho *et al.* (2000), em evento subsequente ao isolamento sináptico do cromossomo B e independentemente de sua origem, seguem-se processos similares de evolução molecular, determinando que estes elementos genômicos podem empreender processos de modificação estrutural, convergindo para uma morfologia degenerada e dessa forma as suas características e estrutura seriam mais um reflexo destes processos de evolução molecular do que a forma em que foram originados. Neste sentido, Araújo *et al.* (2001) apresentaram um dado extremamente interessante sobre a evolução dos cromossomos B. Eles mostraram que, na vespa *Triplexylon albitarse*, estes cromossomos regularizaram seu comportamento meiótico e limitam seu número a um cromossomo por genoma haplóide, indicando que seria possível, após anos de evolução independente, uma integração destes cromossomos ao complemento normal.

As análises moleculares para estes B realizadas neste trabalho reforçam a possibilidade de origem intraespecífica e uma evolução independente, para estes elementos. A presença de marcação no cromossomos B com sonda obtida de indivíduo de outra população, como encontrado em outros trabalhos em peixes da espécie *Poecilia formosa* (Shartl *et al.*, 1995) bem como em plantas do gênero *Coix* (Sapre & Desphande, 1987), em insetos Hymenoptera da espécie *Nosonia Vitripennis* (McAllister & Werren, 1997).

Com base nestas observações, pode-se supor que, através dos tempos, os cromossomos B estariam divergindo quantitativamente através da evolução das seqüências e qualitativamente dos cromossomos do grupo A, através de diferentes tipos de rearranjos concordando com a proposta de Ziegler *et al.* (2003). Em decorrência disto os cromossomos B poderiam

determinar efeitos nos indivíduos que os carregam, ocorrendo algum tipo de interação ou efeito desse cromossomo B com os demais cromossomos do complemento A, como já descrito anteriormente por Camacho *et al.* (2000). Estes autores afirmam que existem amplas evidências de que os cromossomos B, indiretamente, podem afetar um vasto número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas como em animais.

FIGURAS

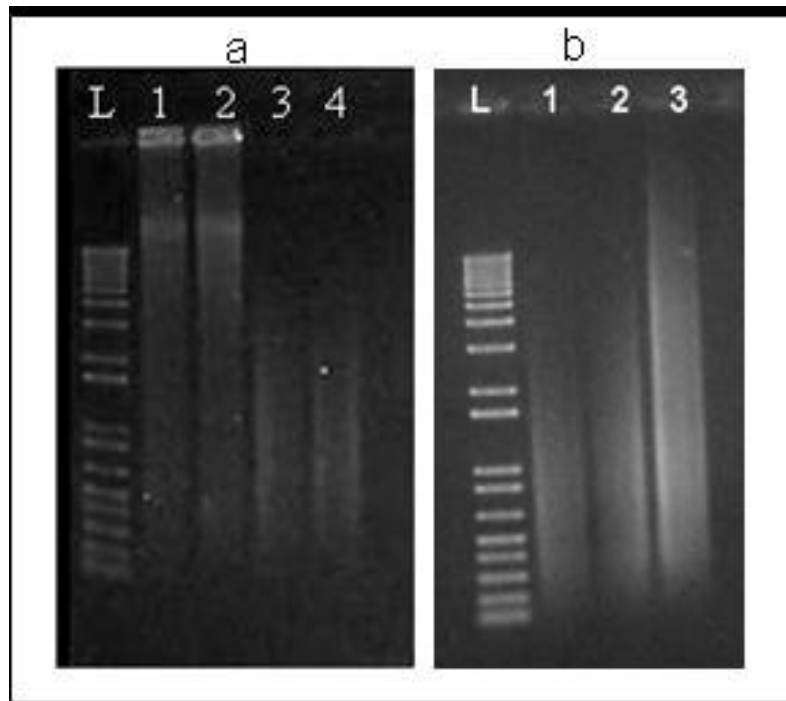


Fig. 1: Gel de agarose 1% apresentando o DNA genômico antes e depois da autoclavagem. **a)** L: 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. **1:** amostra de DNA genômico de um indivíduo sem cromossomo B do córrego Cascatinha antes da autoclavagem; **2:** com cromossomo B do córrego Cascatinha antes da autoclavagem; **3:** sem cromossomo do córrego Cascatinha depois da autoclavagem; **4:** com cromossomo B do córrego Cascatinha depois da autoclavagem. **b)** L: 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. **1 a 3:** amostras de DNAs genômicos de indivíduos com cromossomo B depois da autoclavagem, sendo um do córrego Cascatinha e 2 e 3 das amostras do Ribeirão Água da Madalena.

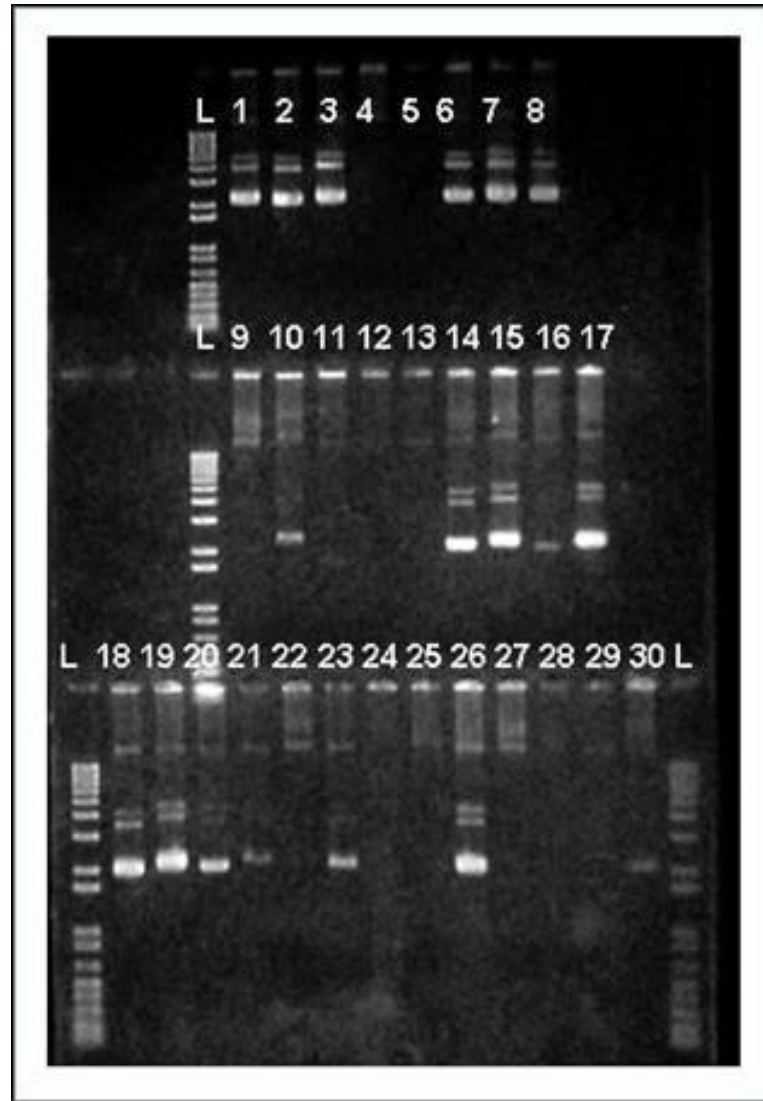


Figura. 2: Fragmentos de DNA genômico de *Astyanax scabripinnis* obtidos por mini preparações em gel de agarose 1%, que foram recuperados. (**L:** 1Kb Plus Ladder DNA - Gibco. Os números de 1 a 30 são as amostras isoladas dos clones. Os clones 1,2,3,6,7,8,10,14,15,16,17,18,19,20,23 e 26 foram positivos, como pode ser visualizado pela intensidade das bandas no gel). O clone número 17 foi o escolhido, aleatoriamente, para ser seqüenciado.

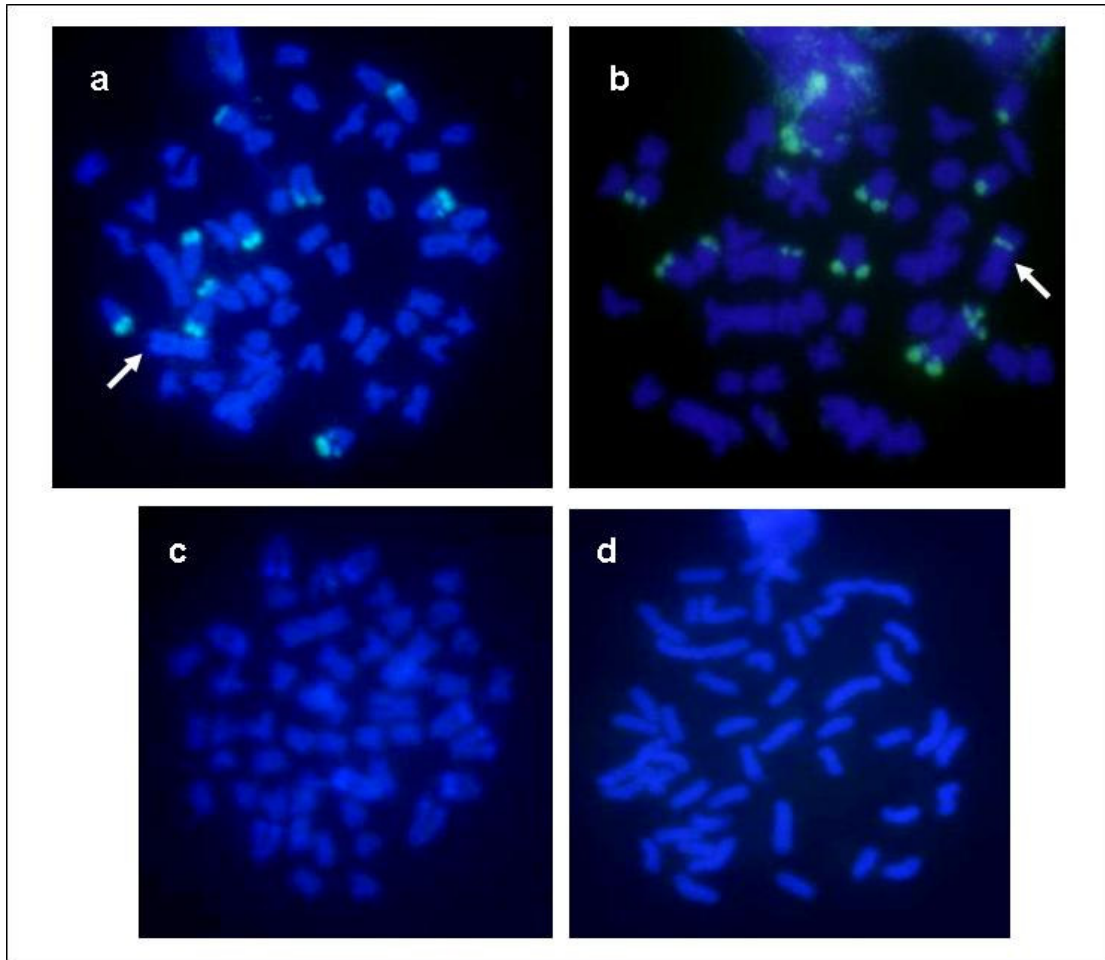


Fig. 4: Identificação de marcação com sonda AsB34a, obtida pela técnica de DNA autoclavado em metáfases somáticas de *Astyanax scabripinnis*. a) indivíduo coletado no córrego Cascatinha (Botucatu-SP) portador de cromossomo supranumerário. Além das marcas fluorescentes visualizadas nos cromossomo do complemento padrão a seta indica o cromossomo B não marcado pela sonda AsB34a. b) indivíduo coletado no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), portador de cromossomo de cromossomo supranumerário. A seta indica o cromossomo B marcado pela sonda AsB34a, corado por DAPI-FITC. c) e d) ausência de marcação pela sonda AsB34a nos cromossomos do complemento A, tanto nos indivíduo coletado no córrego Cascatinha (Botucatu-SP) quanto no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP), em metáfases de indivíduos não portadores de cromossomo supranumerário.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abel, L.D.S.; Mantovani, M.; Moreira-Filho, O. (2006). Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet. and Mol. Biol.*, 29: 448-452.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215: 403-10.
- Araújo, S.M.S.R.; Pompolo, S.G.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. (2001). Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 1127-1131.
- Camacho, J.P.M. (1993). Polimorfisms and geographic distribution. First B-chromosome Conference - *Anais*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Espanha.
- Camacho, J. P. M. & Parker, J. (1993). *First B Chromosome Conference*. Miraflores de la Sierra, Madrid.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukeboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*. 355: 163-178.
- Cavallaro, Z.I.; Bertollo, L.A.C.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, 8: 627-634.
- Comings, (1978). Lateral asymmetry of human chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 30(2): 223-226.
- Comings, D.E. & Drets, M.E. (1976). Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding. *Chromosoma*, 56(3): 199-211.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Galetti Jr., P.M. (1991). Chromosome complement of induced hybrids of the fish *Prochilodus marggravii* and *Prochilodus affinis* (Prochilodontidae, Characiformes). *Brazil. J. Genet.*, 14: 203-204.
- Galetti Jr., P.M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.*, 65: 53-56.
- Jones, R.N. (1995). B chromosomes in plants. Transley Review N°. 85. *New Phytologist*, 131: 411-434.

- [Johnston, D.A.; White, R.A.; Barlogie, B.](#) (1978). Automatic processing and interpretation of DNA distributions: comparison of several techniques. *Comput. Biomed. Res.*, 11(4): 393-404.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. ((submetido à publicação). Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES).
- [Lin, H.J. & Kirsch, J.F.](#) (1977). A sensitive fluorometric assay for avidin and biotin. *Anal Biochem.*, 81(2):442-6.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998a). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Molec. Biol.*, 21: 201-206.
- Maistro, E.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2000). Cytogenetic analysis of A and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) using different restrictions enzyme banding staining methods. *Genetica*, 108: 119-125.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109: 161-168.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 27: 536-542.
- Margarido, V.P. & Galetti Jr., P.M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3): 569-573.
- Margarido, V.P. & Galetti Jr., P.M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 357-361.
- Martins, C. & Galetti Jr, P.M (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- Martins, C. (2005). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F. & Kapoor, B.G. Science Publisher, Inc.; USA.
- McAllister, B.F. & Werren, J.H. (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *N. vitripennis*. *Chromosoma*, 106: 243-253.

- Mestriner, C.A.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S; Moreira-Filho, O., Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1-9.
- Molina, W.F.; Schmid, M.; Galetti Jr., P.M. (1998). Heterochromatin and sex chromosomes in neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios*, 94:1141-149.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 230-234
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E.L.; Foresti, F (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazil. J. of Genet.*, 20: 377-380.
- [Saitoh, Y. & Laemmli, U.K.](#) (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 76(4): 609-22.
- Sapre, A.B. & Desphande, D.S. (1987). Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.*, 78: 191-196.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Schartl, M.; Nanda, I.; Schlupp, I. (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*, 373: 68-71.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner, A.T. (1990). *Chromosome banding*. U. Hyman. Inc., London, p 434.
- Strachan, T. & Read, A. (2002). *Genética Molecular Humana*. 2a ed. Artmed. Porto Alegre, R.S. 576pp.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-80.
- Vieira, M.M.R. (2001). Análise da evolução de populações locais de *Astyanax scabripinnis* da região de Botucatu com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. p128.

Ziegler, C.G.; Lamatsch, D.K.; Steinlein, C.; Engel, W.; Schartl, M.; Schmid, M. (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *A. alburnus* harbours a retrotransposons-derived repetitive DNA sequence. *Chrom. Res.*, 11: 23-35.

[Zwick, M.S.; Islam-Faridi, M.N.; Czeschin Jr., D.G.; Wing, R.A.; Hart, G.E.; Stelly, D.M.; Price, H.J.](#) (1998). Physical mapping of the liguleless linkage group in *Sorghum bicolor* using rice RFLP-selected sorghum BACs. *Genetics*, 148(4): 1983-92.



Discussão Geral e Conclusões

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Considerando as características biológicas de *Astyanax Scabripinnis*, associadas aos seus dados morfológicos, esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna neotropical.

Os dados citogenéticos obtidos nos estudos sobre a espécie escolhida para o presente trabalho, *Astyanax scabripinnis*, confirmam a extensa diversidade cromossômica desta espécie que tem sido relatada em vários trabalhos (Moreira-Filho, 1989; Souza *et al.*, 1995; Maistro *et al.*, 1998a; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Centofante *et al.*, 2003; Neo *et al.*, 2000a) e devido a esta grande diversidade encontrada, esta espécie de peixe tem sido considerada componente de um complexo de espécies por Moreira-Filho & Bertollo (1991), denominado de “complexo *scabripinnis*”.

As razões para esta diversidade parecem decorrer principalmente às características Biológicas deste grupo de peixes, pois *A. scabripinnis*, é uma espécie de água doce, que pode formar pequenas populações isoladas e com uma evolução particular independente, resultando assim na possibilidade de surgirem rearranjos cromossômicos distintos que podem ser fixados em algumas populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Lowe-McConnell (1969) enfatizou que o tamanho absoluto de certos sistemas aquáticos é um importante fator no processo evolutivo dos peixes, desde que muitas espécies estejam envolvidas dentro do mesmo sistema, isolados de rios tributários e habitando lugares com barreiras interpopulacionais, físicas, químicas ou bióticas.

Desde de que as primeiras descrições começaram a serem realizadas em *Astyanax scabripinnis*, no início dos anos 90 por Salvador & Moreira-Filho (1992), alguns indivíduos de algumas populações desta espécie têm mostrado também um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários. A partir destes trabalhos iniciais, macrocromossomos supranumerários foram encontrados também em exemplares do córrego Cascatinha (Botucatu-SP) componente da bacia hidrográfica do rio Tietê e no Ribeirão Água da Madalena (Botucatu-SP) componente da bacia hidrográfica do rio Pardo (afluente do rio Paranapanema), objetos do presente estudo. Neste caso, as diferenças estão associadas a uma diversidade nos padrões de distribuição de segmentos heterocromáticos ao longo desses cromossomos, com grandes diferenças entre as duas populações analisadas. Deve ser ressaltado, entretanto, que nos diversos estudos já realizados em *Astyanax scabripinnis* foram identificados diferentes tipos de cromossomos B, com base na morfologia e no padrão da heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1992; Maistro *et al.*, 1994a,b; Vicente *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000a e b; Maistro *et al.*, 2001; Moreira-Filho *et al.*, 2001, 2004; Fernandes & Martins-Santos, 2005).

O macrocromossomo B encontrado nos exemplares de *Astyanax scabripinnis*, coletados no córrego Cascatinha é do tipo metacêntrico grande, equivalendo em tamanho ao do primeiro par cromossômico do cariótipo, apresentando-se em geral homoganeamente corado (inteiro heterocromático), como já descrito anteriormente por vários autores para esta localidade (Maistro *et al.*, 1994a, Porto-Foresti *et al.*, 1997, Maistro *et al.*, 1998, Maistro *et al.*, 2001). Neste trabalho, os cromossomos B dos indivíduos coletados no Córrego Cascatinha que foram submetidos ao bandeamento C também se mostraram homoganeamente corado, Porém apresentando coloração mais clara do que as conspícuas bandas heterocromáticas encontradas nos cromossomos do complemento A (Figura 2, capítulo II). Esta característica de coloração diferenciada foi nomeada de pseudo-heterocromático e considerou-se que poderia estar relacionada mais a uma limitação metodológica na captura de imagens, anteriormente envolvendo processo realizado por filmes e ampliações manuais em papel Kodak, que poderiam interferir na qualidade do contraste obtido para as diferentes regiões cromossômicas permitindo a sua verdadeira visualização. Neste trabalho, as imagens foram capturadas no fotomicroscópio através de uma câmera digital DP70 (Olympus) e processadas pelo programa computacional Adobe Photoshop 7.0, fornecendo, assim, melhores condições de análise das preparações.

A heterocromatina constitutiva tem sido comumente caracterizada em diferentes organismos através do bandeamento C. Entretanto, do ponto de vista composicional, esta técnica não permite distinguir as diferentes classes de DNAs heterocromáticos que podem ocorrer dentro do genoma de uma dada espécie. Desta forma, as diferentes técnicas utilizadas neste trabalho puderam contribuir para um melhor entendimento de suas características e distribuição ao longo dos cromossomos do complemento padrão e principalmente do cromossomo B.

Através da técnica de RAPD, foi possível isolar bandas diagnósticas para o cromossomo B, de exemplares do córrego Cascatinha, dos quais foram produzidas as sondas denominadas de AsRI e AsRVII, que foram utilizadas na hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Sua localização demonstrou homologia apenas com o cromossomo B dos indivíduos coletados no Córrego Cascatinha, não sendo observada qualquer marcação nos outros cromossomos do complemento padrão e com estas mesmas sondas também não foi possível evidenciar quaisquer marcações no cromossomo B dos indivíduos coletados no Ribeirão Água da Madalena, bem como nos cromossomos do complemento A dos indivíduos desta amostra.

Estes resultados podem indicar que os cromossomos supranumerários encontrados nos indivíduos das duas populações estudadas poderiam ter tido a mesma origem, passando subsequente

porem por uma transição para a neutralidade ou “parasitismo”, que freqüentemente é acompanhada de diferentes processos de heterocromatinização dos elementos (Jones & Rees, 1982), tornando-se então completamente diferentes, numa trajetória comum de evolução dos cromossomos B. Outra alternativa para explicar tais diferenças proporia que, após terem a mesma origem, teriam passado por processos de evolução independentes, como proposto por alguns pesquisadores como Beukeboom (1994). Neste caso, a proposição seria de que os cromossomos B teriam evolução paralela à dos cromossomos A, sofrendo algum tipo de alteração que os tornam diferentes dentro do genoma de seus portadores, envolvendo inativação de genes e heterocromatinização diferenciada.

Por microdissecação de macrocromossomos supranumerários do tipo metacêntrico de *Astyanax scabripinnis*, a partir de preparações cromossômicas de indivíduos coletados no córrego Cascatinha, foi possível obter a sonda AsMB. Esta hibridou na forma de marcas dispersas nos cromossomos B de todos os indivíduos portadores de cromossomos supranumerário desta população, mas não foi observada nenhuma marcação nos cromossomos do complemento A dos indivíduos com e sem cromossomos B. Tal comportamento de associação sugere a ocorrência de aparente amplificação preferencial de algumas regiões desses cromossomos. O comportamento de associação da sonda tanto para o cromossomo B quanto para os cromossomos do complemento A parecem apontar para um processo de origem independente do cromossomo B, desta população, em relação aos demais componentes do cariótipo.

É importante salientar também que a aplicação da técnica de microdissecação cromossômica em estudos de cromossomos de peixes é uma novidade nos laboratórios do país, embora já venha sendo bastante utilizada em vários trabalhos citogenéticos há algum tempo, principalmente na construção e caracterização de sondas específicas para cromossomos B de vários organismos. Contudo, é interessante notar que marcações dessa sonda puderam ser visualizadas nos núcleos interfásicos de preparações cromossômicas de indivíduos portadores de cromossomo B, mostrando o posicionamento do cromossomo B nesta fase, reforçando a eficiência da técnica.

A técnica de C_{ot} -1 DNA, aprimorada no presente trabalho para isolamento de diferentes seqüências repetitivas, mostrou-se promissora como ferramenta a ser empregada não somente no isolamento e caracterização de seqüências repetitivas do cromossomo B, mas como

alternativa para melhor compreender a estrutura final dos cromossomos moldados pelos processos de evolução molecular e melhor caracterizar a composição da heterocromatina constitutiva existente nos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis*. A aplicação desta técnica possibilitou a seleção de um clone, que foi elaborado e marcado com corantes fluorescentes.

A hibridação *in situ* fluorescente da sonda AsB34a, possibilitou observar a localização dessas seqüências de DNA repetitivos e como elas estão organizadas nos cromossomos metafásicos de *Astyanax scabripinnis* de indivíduos portadores e não portadores de cromossomo B para ambas as localidades. Esta hibridação revelou marcações nítidas em vários cromossomos do complemento A similares aos obtidos pelo bandeamento C, para ambas as localidades. Nos indivíduos portadores de cromossomos B da população do Ribeirão Água da Madalena também foi observada uma região intersticial marcada no cromossomo B desses indivíduos. Contudo, não foi possível observar este mesmo padrão e nenhum outro tipo de marcação nos cromossomos do complemento A, em todos os indivíduos não portadores de cromossomos B analisados.

A ausência deste tipo de marcação, em indivíduos não portadores de cromossomos B, poderia estar relacionado com a organização destas seqüências repetitivas, que poderiam estar associadas à presença dos B ou ainda estarem dispersas, não possibilitando sua observação por esta técnica. Desta forma, as bases contidas na sonda AsB34a poderiam ser insuficientes para sua detecção por DAPI-FITC, como já descrito ocorrer por Comings & Drets, 1976; Comings, 1978; Johnston et al., 1978). Além disso, a organização estrutural das seqüências heterocromáticas nos cromossomos de forma dispersa, como explorado anteriormente por (Saitoh & Laemmli, 1994), também poderiam se constituir nos fatores responsáveis pela não detecção dos sinais produzidos, caso eles existam nestes segmentos cromossômicos.

Em tentativas recentes formuladas para explicar a evolução independente dos cromossomos B no genoma de seus organismos portadores alguns autores como Camacho *et al.* (2000) afirmam que subsequente ao isolamento sináptico do cromossomo B e independentemente de sua origem, estes seguiriam processos similares de evolução molecular, direcionando-se para uma morfologia degenerada e alterações internas particulares. Dessa forma, as suas características seriam mais um reflexo destes processos de evolução molecular do que a forma em que foram originados. Além disso, Araújo *et al.* (2001) apresentaram um dado extremamente interessante sobre a evolução dos cromossomos B, ao mostrarem que na vespa *Triplexylon albitarse* os cromossomos B

regularizaram seu comportamento meiótico e limitam seu número a um cromossomo por genoma haplóide. Tal fato poderia indicar que seria possível, após anos de evolução independente, uma integração destes cromossomos ao complemento normal.

As análises citogenéticas e moleculares dos cromossomos B realizadas no presente trabalho parecem reforçar a hipótese de uma evolução independente destes elementos genômicos na amostra estudada. Isto não descarta a possibilidade da manutenção de certos segmentos nos elementos modificados ou sua transferência a partir dos cromossomos do complemento A, pois uma sonda (AsB34a), que foi obtida de DNA de um indivíduo portador de cromossomo B da população do córrego Cascatinha, somente hibridou no cromossomo B da outra população como encontrado em outros trabalhos em peixes da espécie *Poecilia formosa* (Shartl *et al.*, 1995) bem como em plantas do gênero *Coix* (Sapre & Desphande, 1987) e em insetos Hymenoptera da espécie *Nosonia Vitripennis* (McAllister & Werren, 1997). Não pode ser desconsiderada a hipótese da perda deste segmento repetitivo apenas na população original.

Com base nestas observações, pode-se supor que, através dos tempos, os cromossomos B estariam divergindo quantitativamente através da evolução das seqüências e qualitativamente dos cromossomos do grupo A, através de diferentes tipos de rearranjos conforme já formulado por (Ziegler *et al.*, 2003). Além disso, os cromossomos B podem determinar vários efeitos nos indivíduos que os carregam, ocorrendo certos tipo de interação entre estes e os cromossomos do complemento A, como já descrito anteriormente por Jones & Rees (1968), Nur & Brett, (1988) e Camacho *et al.* (2004). Estes autores afirmam ainda que existem amplas evidencias de que os cromossomos B, indiretamente, poderiam, afetar um vasto número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas como em animais.

Apesar de alguns cromossomos B apresentarem efeitos diretos e indiretos no comportamento genético de seus portadores, muito mais pesquisas são necessárias para verificar em peixes se os cromossomos B apresentam genes ativos e quais os efeitos desses para os indivíduos portadores e estes efeitos dependem das condições ambientais nas quais populações que os carregam se encontram, tendo-se em conta ainda que tais efeitos podem apresentar variação tanto temporal quanto espacial (Camacho *et al.*, 2004). Considera-se, pois que o verdadeiro papel dos cromossomos B dentro do genoma, ainda está para ser esclarecido.

Considerações Finais

A alta diversidade cariotípica encontrada em *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2004; Moreira-Filho *et al.*, 2004), proporciona um modelo interessante de estudos citogenéticos, quer em nível de macroestrutura cariotípica dos peixes, quer no nível microestrutural e molecular. Neste sentido, Abel *et al.* (2006), postula que a combinação de técnicas deve ser valorizada na investigação qualitativa da heterocromatina constitutiva em peixes. Com aplicação das técnicas citogenéticas e moleculares utilizadas no presente

trabalho foram possível obter novas informações sobre a estrutura morfológica e molecular dos cromossomos desta espécie, principalmente dos cromossomos supranumerários.

Sondas cromossômicas obtidas a partir de seqüências específicas dos cromossomos B de indivíduos capturados na população do córrego Cascatinha, não resultam em sinais de hibridação quando associadas às preparações cromossômicas de indivíduos da população do Ribeirão Água da Madalena, também apresentando cromossomo supranumerário. Estas sondas deram resultados positivo e específico apenas para região do cromossomo B dos indivíduos da população doadora, não sendo detectadas marcações nos cromossomos do complemento normal de cromossomos. Ficam caracterizadas assim, novas sondas identificadoras de regiões intersticiais do macrocromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, específicas até o presente momento dos indivíduos da população do córrego Cascatinha. Tais resultados permitem acrescentar informações sobre a diversificação molecular dos cromossomos supranumerários desta espécie, reforçando a hipótese de que estes elementos genômicos, após seu aparecimento no genoma de uma espécie, podem sofrer processos de modificação independente, desenvolvendo seu próprio caminho evolutivo.

A adaptação de metodologias para estudo da estrutura e composição dos cromossomos de peixes foi enriquecida com a aplicação da técnica de microdissecação cromossômica para isolar o macrocromossomo supranumerário de *Astyanax scabripinnis*. A partir da obtenção destes elementos isolados, foi possível usar metodologia de análise molecular para amplificação de segmentos genômicos destes cromossomos, realizarem sua ligação a corantes fluorescentes e hibridizar por microFISH em preparações cromossômicas da espécie portadora. Os resultados de hibridação obtidos com marcações fortes nos núcleos das células somáticas mas apenas em região intersticial do cromossomo B parecem indicar a ocorrência de amplificação preferencial de certos segmentos e, portanto, a marcação de regiões específicas do cromossomo.

Informações obtidas com a aplicação da técnica de fragmentação do DNA em autoclave para posterior subclonagem mostraram-se interessantes. Uma vez que a técnica de bandeamento C é apenas quantitativa em relação à heterocromatina presente nos cromossomos, não discriminando tipos diferentes, a aplicação desta técnica poderia revelar diferentes tipos de DNA repetitivo. A partir da fragmentação do DNA dos indivíduos da população do córrego Cascatinha, foram obtidos diversos clones e um deles (B34a) foi caracterizado para produção de uma sonda fluorescente (AsB34a). Este tipo de repetitivo analisado resultou em hibridação positiva em regiões compatíveis, às de banda C, identificadas em alguns cromossomos do complemento A do cariótipo de indivíduos da população doadora e de indivíduos da população do Ribeirão Água da Madalena, portadores de cromossomos B, porém a sonda marcou o cromossomo supranumerário, em posição intersticial de um dos braços, apenas dos indivíduos da população do Ribeirão Água da Madalena. Os indivíduos sem cromossomos B não apresentaram qualquer marcação com esta sonda, em ambas as populações estudadas.

Estes resultados parecem indicar um possível efeito da presença do cromossomo B associado à existência de regiões repetitivas nos cromossomos do complemento A, detectadas pela sonda AsB34a. Não pode ser descartado, contudo, que a ausência de marcação seja decorrente da inexistência destas regiões repetitivas nos cromossomos dos indivíduos sem cromossomos B ou que sejam pequenas e dispersas, não sendo assim detectadas por esta técnica.

Considera-se, assim, que os resultados obtidos acrescentam informações sobre a estrutura dos cromossomos supranumerários em *Astyanax scabripinnis* e, por conseguinte, sobre estes segmentos genômicos nos peixes. O estudo destes novos marcadores obtidos, quando realizado em outras populações desta espécie e em outras espécies de peixes, poderá proporcionar condições para uma melhor compreensão da composição, estrutura e função, bem como da origem e evolução deste tipo de cromossomos nos organismos.



Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, L.D.S.; Mantovani, M.; Moreira-Filho, O. (2006). Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 448-452.
- Alberdi, A.J. & Fenocchio, A. (1997). Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia*, 62:171-176.
- Alfenito, M.R. & Birchler, J.A. (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, 135: 589-597.
- Almeida-Toledo, L.F. 1978. Contribuição à Citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 128pp.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. Toledo-Filho, S.A. (1985). Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 66: 85-88.
- Almeida-Toledo, L.F.; Viegas-Péquignot, E.; Foresti, F.; Toledo-Filho, A.S.; Dutrillaux, B. (1988b). BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 48: 117-120.
- Almeida-Toledo, L.F.; Daniel-Silva, M.F.Z.; Lopes, C.E.; Toledo-Filho, S.A. (2000). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Research*, 8:335-340.
- Al-Sabti, K.; Fijan, N; Kurelec, B. (1983). A simple and fast technique for the chromosome preparation in the fish. *Vet. Arhiv.*, 53: 283-290.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215: 403-10.
- Amos, A. & Dover, G. (1981). The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tse-tse): a two step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma*, 81: 673-690.
- Andreatta, A.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Oliveira, C.; Toledo, S.A. (1992). Chromosome studies in Hipoptopomatinae (pisces, Siluriformes, Loricariidae): XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, 57: 369-372.
- Anleitner, J.E. & Haymer, D.S. (1992). Y enriched and Y specific DNA sequence from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Chromosoma*, 101: 271-278.
- Araújo, S.M.S.R.; Pompolo, S.G.; Dergam, J.A.S.; Campos, L. A. O. (2000). The B chromosome system of *Trypoxylon albitarse* (Trypargilurn) (Hymenopter, Sphecidae) I. banding analysis. *Cytobios*, 101: 7-13.
- Araújo, S.M.S.R.; Pompolo, S.G.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. (2001). Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 1127-1131.
- Artoni, R.F. (1999). Citogenética do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Triportheus* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 79pp.
- Artoni, R.F.; Falcão, J.N.; Moreira-Filho, O. (2001). An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Research*, 9: 449-456.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Endler, A.L.; Cavallaro, Z.I.; Jesus, C.M.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of

- Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*, 127: 277-284.
- Bakkali, M.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. (2002). The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. II. Parasitic and neutralized B₁ chromosomes. *Heredity*, 88: 14-18.
- Bang, J.W. & Choi, H.W. (1990). Genetic analysis of esterase isozymes in rye (*Secale cereale* L.). *Korean Journal of Genetics*, 12: 87-94.
- Bates, G.P.; Wainwright, B.J.; Williamson, R.; Brown, S.D.M. (1986) Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol. Cell Biol.*, 6: 3826-3830.
- Bardacki, F. & Skibinski, D.O.F. (1994). Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-23.
- Baverstok, P.R.; Wats, C.H.S.; Hogarth, J.T. (1976). Heterochromatin variation in Australian rodent *Uromys caudimaculatus*. *Chromosoma*, 59: 397-403.
- Berend, S.A.; Hale, D.W.; Enstrom, M.D.; Greenbaum, I.F. (2001). Cytogenetics of collared lemming (*Dicrostonyx groenlandicus*). II. Meiotic behaviour of B chromosomes suggests a Y-chromosome origin of supernumerary chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 95: 85-91.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic Considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1:103-120.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 2:17-37.
- Bertollo, L.A.C. & Cavallaro, Z.I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 60:60-63.
- Bertollo, L.A.C.; Fontes, M.S.; Fenocchio, A.S.; Cano, J. (1997). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, 5:493-499.
- Bertollo, L.A.C. & Mestriner, C.A. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analysis. *Chromosome Research*, 6:141-147.
- Bertollo, L.A.C.; Franco, w.; Fontes, M.S.; Pastori, M.C.; Oliveira, C.; Fenocchio, A.S. (2002). Diversidade cariotípica em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae). Análises populacionais. *Resumos do IX Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, pp.31.
- Battaglia, E. (1964). Cytogenetics of B-chromosomes. *Cariologia* 17:245-299.
- Beukeboom, L.M. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*, 73:328-336.
- Bidau, C.J. & Martí, D.A. (2004). B chromosomes and Robertsonian fusions of *Dichroplus pratensis* (Acrididae): intraspecific support for the centromeric drive theory. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 347-350.
- Bielawski, J.P. & Pumo, E.D. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Hereditas*, 78:32-40.
- Borin, L.A.; Martins-Santos, I.C.; Oliveira, C. (2002). Natural Triploid in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae): Mitotic and Meiotic Characterization by Chromosome Banding and Synaptonemal Complex Analyses. *Genetica*, 115: 253-258.

- Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. (2000). An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8: 111-118.
- Borowsky, R.L.; McClelland, M.; Welsh, J. (1995). Arbitrarily primed DNA fingerprints for phylogenetics reconstruction in vertebrates: the *Xiphophorous* model. *Molecular biology and evolution*, 12: 1022-32.
- Bougourd, S.M. & Jones, R.N. (1997). B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytol*, 137: 43-54.
- Boyes, J.W. & Van Brink, J.M. (1967). Chromosomes of *Syrphidae* III. Karyotypes of some species in the tribes milesiini and Myoleptini. *Chromosoma* 22: 417-455.
- Blunden, R.; Wilkes, T.J.; Forster, J.W.; Jimenez, M.M.; Sandery, M.J.; Karp, A.; Jones, R.N. (1993). Identification of the E3900 family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome*, 36: 706-11.
- Brinkman, J.N.; Sessions, S.K.; Houben, A.; Green, D.M. (2000). Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 88: 124-129.
- Brutlag, D.L. (1980). Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annual Review of Genetics*, 14: 121-144.
- Cabrero, J.; Alché, J.O.; Camacho, J.P.M. (1987). Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome. *Genome*, 29: 116-121.
- Caccone, A.; Allegrucci, G.; Fortunato, C.; Sbordoni, V. (1997). Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *Journal of Heredity*, 88: 316-24.
- Cagigas, M.E.; Vasquez, E.; Blanco, G.; Sánchez, J.A. (1999). Combined assessment of genetic variability in populations of brook trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Molecular Biotech*, 1:286-96.
- Calcagnoto, D. (1989). Variabilidade cromossômica na espécie *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) de 3 localidades do Estado do Rio Grande do Sul. Monografia (Bacharelado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.**
- Camacho, J.P.M. (1993). Polimorfismos and geographic distribution. First B-chromosome Conference - *Anais*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Espanha.
- Camacho, J. P. M. & Parker, J. (1993). *First B Chromosome Conference*. Miraflores de la Sierra, Madrid.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukeboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B.*, 355: 163-178.
- Camacho, J.P.M.; Perfectti, F.; Teruel, M. (2004). The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenet. Cell Genet.* 106: 325-331.

- Camacho, J.P.M. (2005). *B chromosomes*. In: Gregory, T.R. The evolution of the genome. San Diego, California, USA, p. 223-286.
- Cavallaro, Z.I.; Bertollo, L.A.C.; Perfectti, F.; Camacho, J.P.M. (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, 8: 627-634.
- Carlson, W. R. & Rosemam, R.R. (1992). A new property of the maize B chromosome. *Genetics*, 131: 211-223.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Justi, A.J.; Moreira-Filho, O. (2003). Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). *Ichthyo Explor Freshwaters*, 14:361-368.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Wolfgang, S. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 37:215-220.
- Chen, H. & Leibenguth, F. (1995). Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers, and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochem Genetics*, 33: 297-306.
- Cheng, Y.M. & Lin, B.Y. (2003). Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*, 164: 299-310.
- Chiavarino, A.M.; Rosato, M.; Manzanero, S.; Jiménez, G.; González-Sánchez, M.; Puertas, M.J. (2000). Chromosome nondisjunction and instabilities in tapetal cells are affected by B chromosomes in maize. *Genetics*, 155: 889-897.
- Chilton, M.D. & MacCarthy, B.J. (1973). DNA from maize with and without B chromosomes: a comparative study. *Genetics*, 74: 605-614.
- Comings, (1978). Lateral asymmetry of human chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 30(2): 223-226.
- Comings, D.E. & Drets, M.E. (1976). Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding. *Chromosoma*, 56(3): 199-211.
- Corazza-Bassetto, L.C.Q.; Revaldaves, E.; Oliveira, C.; Foresti, F. (submetido à publicação). Combined assessment of genetic variability in populations of *Geophagus brasiliensis* based on RAPD and mitochondrial DNA markers. *Genetics and Molecular Biology*.
- Covert, S.F. (1998). Supernumerary chromosome in filamentous fungi. *Curr. Genet.*, 33: 311-319.
- Crossland, S.; Coates, D.; Grahame, L.; Mill, P.J. (1993). Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in separating two sibling species of *Littorina*. *Mar Ecol Progr Ser*, 96: 301-05.
- Csink, A.k. & Henikoff, S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics*, 14 (5): 200-2004.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. (1994). Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by in situ hybridisation. *Genome*, 37: 709-712.
- Cuellar, O. & Uyeno, T. (1972). Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics*, 11: 508-515.
- Dantas, E.S.O. (2002). Estudos citogenéticos comparativos em três espécies de *Moenkhausia* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) de localidades diferentes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Deininger, P.L.; Moran, J.V.; Batzer, M.A.; Kazazian Jr, H.H. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in genetics & Development*, 13: 651-658.

- Delgado, M.; Morais-Cecilio, L.; Neves, N.; Jones, R.N.; Viegas, W. (1995). The influence of B chromosome on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Research*, 3: 487-491.
- Deng, H.X.; Yoshiura, K.I.; Dirks, R.W.; Harada, N.; Hirota, T.; Tsukamoto, K.; Jinno, Y.; Niikawa, N. (1992). Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Hum. Genet.*, 89: 13-17.
- Dergan, J.A.; Suzuki, H.I.; Shibatta, O.A.; Duboc, L.F.; Júlio Jr, H.F.; Giuliano-Caetano, L.; Black Iv, W.C. (1998). Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21: 493-96.
- Dergan, J.A.; Paiva, S. R.; Schaeffer, C.E.; Godinho, A.L.; Vieira, F. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabáricus* (Bloch, 1794) (Pices, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4): 379-287.
- Dessauer, H.C.; Reeder, T.W.; Cole, C.J.; Knight, A. (1996). Rapid screening of DNA diversity using dot-blot technology and allele-specific oligonucleotides: maternity of hybrids and unisexual clones of hybrid origin (lizards, Cnemidophorus). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 6(3): 366-72.
- Dias, A.L. (1994). Estudo do complexo sinaptonêmico de peixes *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) e *Astyanax scabripinnis* (Characidae): análises da sinapse dos cromossomos supranumerários. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, Brazil.
- Dias, A.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1998). Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae). *Caryologia*, 15: 105-113.
- Dinesh, K.R.; Lim, T.M.; Chua, K.L.; Chan, W.K.; Phang, V.P. (1993). RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool Sci*, 10: 849-54.
- Donald, T.M.; Leach, C.R.; Clough, A.; Timmis, J.N. (1995). Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichrosomatica*. *Heredity*, 74: 55&-561.
- Doolittle, W.F. & Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603.
- Dover, G.A. & Henderson, S.A. (1975). No detectable satellite DNA in supernumerary chromosomes of the grasshopper *Myrmeleolettix*. *Nature*, 259: 57-59.
- Eenennaam, A.L.; Eenennaam, J.P.V.; Medrano, J.F.; Doroshov, S.I. (1996). Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 147: 177-89.
- Eickbush, D.G.; Eickbush, T.H.; Werren, J.H. (1992). Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma*, 101: 575-583.
- Eigenmann, C.H. (1921). The american characidae. *Memoirs of Museum comparative zoology*, 43: 227-310.
- Elo, K.; Ivanoff, S.; Vuorinen, J. Á.; Piironen, J. (1997). Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, 152: 55-65.
- Fagundes, V.; Christoff, A.U.; Scalzi-Martin, J.; Hozier, J.; Moreira-Filho, C.A.; Yonenaga-Yassuda, Y. (2000). XY translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet*, 88(1-2):124-9.

- Falcão, J.N., Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (1984). An additional chromosome in two fishes species. *Rev. Bras. Genet.*, 7: 109-118.
- Falcão, J.N. (1988). Caracterização cromossômica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Fauaz, G.; Vicente, V.E.; Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev. Bras. Genet.*, 17: 157-163.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Alves-Brinn, M.N.; Mendonça, M.N.C.; Benzaquem, D.C. (2004). B chromosomes in Amazonian cichlid species *Cytopgenet. Genome Res.* 106: 195-198.
- Fenocchio, A.S. & Bertollo, L.A.C. (1990). Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193-198.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2005). Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica*, 124: 301-306.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. p.220.
- Ferro, D.A.M.; Neo, D.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2001). Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.
- Ferro, D.A.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2003). B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, 119: 147-153.
- Ficher, C.; Bouneau, L.; Coutanceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volff, J.N. (2004). Global heterochromatic co-localization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 336: 175-184.
- Franks, T.K.; Houben, A.; Leach, C.R.; Timmis, J.N. (1996). The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichrosomatica*. *Chromosoma*, 105: 223-230.
- Fröst, S. (1957). The inheritance of the accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. *Hereditas*, 43: 403-421.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L. F.; Toledo, S. A. (1981). Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and cell Genetics*, 31: 137-144.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L. F.; Toledo, S. A. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79: 107-114.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Foresti, F. (1998). Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Resumo A1, Londrina-PR.
- Galetti Jr. PM & Foresti, F. (1987). Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationships in the phylogeny of the group. *Rev. Brasil. Genet.*, p 135-140.

- Galetti Jr., P.M. (1991). Chromosome complement of induced hybrids of the fish *Prochilodus marginatus* and *Prochilodus affinis* (Prochilodontidae, Characiformes). *Brazil. J. Genet.*, 14: 203-204.
- Galetti Jr., P.M.; Lima, N.R.W.; Venere, P.C. (1995). A monophyletic ZW chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia* 60: 375-382.
- Galetti Jr., P.M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.*, 65: 53-56.
- Galetti Jr, P.M. & Martins, C. (2004). *Contribuição da hibridação in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes*. In: Guerra M (Ed). Fluorescence in situ hybridization: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto, SBG, p. 61-88.
- Gibson, I. & Hewitt, G.M. (1972). Isolation of DNA from B chromosomes in grasshoppers. *Nature*, 255: 67-68.
- Giuliano-Caetano, L. & Bertollo, L.A.C. (1990). Karyotypic variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (pisces, Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of natural triploidy. *Rev. Bras. Genet.*, 13(2): 231-237.
- Gold, L.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S.; Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Goldman, M.A.; Holmquist, G.P.; Gray, M.C.; Caston, L.A.; Nag, A. (1984). Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science*, 224: 686-692.
- Gourmet, C. & Rayburn, L. (1996). Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. *Heredity*, 77: 240-244.
- Green, D.M. (1988). Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma*, 97: 55-70.
- Green, D.M.; Zeyl, C.W.; Scharbel, T.F. (1993). The evolution of hypervariable sex and supernumerary chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *J. Evol. Biol.*, 6: 417-441.
- Green, D.M. (1990). The chromosomes in some lower chordata. *Chomosome*, 21: 181-188.
- Green, D.M. (2004). Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 235-242.
- Gropp, A.; Olbrich, M.; Santadusit, A.; Manyanodha, K.; Flatz, G.; Marshall, J. (1970). Chromosomes of the house rat, *Rattus rattus*: finding in an Asiatic population. *Mammalian Chrom. Newsl*, 11: 111.
- Guerra, M. (1988). Introdução a Citogenética Geral. *Editora Guanabara*, Rio de Janeiro.
- Gutknecht, J.; Sperlich, D.; Bachmann, L. (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma*, 103: 539-544
- Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti Jr, P.M.; Huntington, W. (1993). Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1: 77-86.
- Hafez, R.; Labat, R.; Quiller, R. (1981). Reserches sur les chromosomes supernumeraires de l'ablettes (*Alburnus alburnus* L.). *Cybium*, 5: 81-87.

- Håkansson, A. (1945). Überzählige chromosomen in einer rasse von *Godetia nulans* Hiorth. *Bat Notiser*, 2: 1-19.
- Håkansson, A. (1948). Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. *Hereditas*, 34: 35-59.
- Harvey, S.C.; Masabanda, J.; Carrasco, L.A.; Bromage, N.R.; Penman, D.J.; Griffin, D.K. (2002). Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. *Cytogenet Genome Res*, 97(1-2): 76-80.
- Hayman, D.L. & Martin, P.C. (1965). Supernumerary chromosomes in the marsupial *Shoibates volans* (Kerr.). *Aust. J. Biol. Sci.*, 18:1081-1082.
- Hayman, O.L.; Martin, P.G.; Waller, P.E. (1969). Parallel mosaicism of supernumerary chromosomes and sex chromosomes in *Echymipera kalubu* (marsupialia). *Chromosoma*, 27: 371-380.
- Hewitt, G.M. (1979). *Grasshoper and crickets*. In: John, B. ed. Animal Cytogenetics, 3: Insecta 1 Orthoptera. Berlin, Struttgard: Gebruder Borntraeger.
- Houben, A.; Kynast, R.G.; Heim, U. (1996). Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 105: 97-103.
- Houben, A.; Leach, C.R.; Verlin, D.; Rofe, R.; Timmis, J.N. (1997a). A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, 106: 513-519.
- Houben, A.; Belyaev, N. D.; Leach, C.R.; Timmis, J.N. (1997b). Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromatica*. *Chromosome Research*, 5: 233-237.
- Houben, A.; Thompson, N.; Ahne, R.; Leach, C.R.; Verlin, D.; Timmis, J.N. (1999). A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromatica* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 219: 127-135.
- Houben, A.; Field, B.L.; Saunders, V.A. (2001). Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. *Methods in Cell Science*, 23: 115-124.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hu, P.; Yu, L.; Zhang, M.; Fan, Y.; Wang, X.; Zhao, S. (1998). Rapid selection of the gradually shortened DNA clones by using PCR amplification. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. Chinese, 15(1):46-8.
- Hu, L.; Sham, J.S.; Tjia, W.M.; Tan, Y.Q.; Lu, G.X.; Guan, X.Y. (2004). Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. *Genomics*, 83(2):298-302.
- Imai, H.T. (1974). B-chromosomes in the myrmecine and *Lepthorax spinosior*. *Chromosoma*, 36: 431-444.
- Imai, H.T.; Crozier, R.H.; Taylor, R.W. (1977). Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma*, 59: 341-393.
- Imai, H.T.; Brown Jr, W.L.; Kubota, M. (1984). Chromosomes observations of tropical ants in westem Malasya. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet*, 34: 66-69.
- Jamilena, M.; Rejón, M.R.; Rejón, C.R. (1994). A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. *Joumal of Cell Science*, 107: 703-708.

- Jamilena, M.; Garrido-Ramos, M.; Rejón, M.R.; Rejón, C.R.; Parker, J.S. (1995). Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaries*. *Chromosoma*, 104: 113-120.
- Jesus, C.M. & Moreira-Filho, O. (2000a). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei Parodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 11: 75-80.
- Jesus, C.M. & Moreira-Filho, O. (2000b). Cytogenetics studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia*, 65: 397-402.
- Jesus, C.M.; Galetti Jr., P.M.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, 118: 25-32.
- Johnson, S.L.; Midson, C.N.; Ballinger, E.W.; Postlethwait, J.H.; (1994). Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish. *Genomics*, 19: 152-56.
- Johnston, D.A.; White, R.A.; Barlogie, B. (1978). Automatic processing and interpretation of DNA distributions: comparison of several techniques. *Comput. Biomed. Res.*, 11(4): 393-404.
- Jones, R.N. & Rees, H. (1968). The influence of B-chromosome upon the nuclear phenotype in rye. *Chromosoma*, 24:158-176.
- Jones, R.N. (1975). B Chromosome systems in flowering plants and animal species. *Int. Rev. Cytol.*, 40: 1-100.
- Jones, R.N. & Rees, H. (1982). *B chromosomes*. Academic Press, New York, 249 p.
- Jones, R.N. (1991). B-chromosome drive. *The American Naturalist*, 137(3): 430-442.
- Jones, R.N. & Puertas, M.J. (1993). The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.). In: eds. Dhir KK, Sareen TS *Frontiers in Plant Science Research*, Chapter 6. Delhi (India):Bhagwati Enterprises, p. 81-112.
- Jones, R.N. (1995). B chromosomes in plants. Transley Review Nº. 85. *New Phytologist*, 131: 411-434.
- Jones, R.N. & Diez, M. (2004). The B chromosome database. *Cytogenet Genome Res*, 106: 149-150.
- Karamysheva, T.V.; Andreenkova, O.V.; Bochkaev, M.N.; Borissov, Y.M.; Bogdanchikova, N.; Borodin, P.M.; Rubtsov, N.B. (2002). B chromosomes of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. *Cytogenet. Genome Res.*, 96: 154-160.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. ((submetido à publicação). Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES).
- Kayano, H. (1957). Cytogenetic studies in *Lillium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. *Proc. Jap. Acad.*, 33: 553-558.
- Kayano, H. (1971). Accumulation of B chromosomes in the germ-line of *Locusta migratoria*. *Heredity*, 27: 119-123.
- Kazazian, H.H.; Wong, C.; Youssoufian, H.; Scott, A.F.; Phillips, D.G. (1988). Haemofilia: a resulting from *the novo* insertion of L1 sequences represent a novel mechanism of mutation in man. *Nature*, 332: 164-166

- Kazianis, S.; Morizot, D.C.; Mcentire, B.B.; Nairn, R.S.; Borowsky, R.L. (1996). Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP-PCR/RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups. *Genome Res.*, 6: 280-89.
- Kenton, A. (1991). Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). *Chromosoma*, 100: 467-478.
- Kidwell, M.G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115: 49-63.
- King, I.P.; Purdue, K.A.; Rezanoor, H.N.; Koebner, R.M.D.; Miller, T.E.; Reader, S.M.; Nicholson, P. (1993). Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic *in situ* hybridization. *Theor.AppL Genet.*, 86: 895-900.
- Klein, A.S. & Eckhardt, R.A. (1976). The DNAs of the A and B chromosomes of the mealy bug, *Pseudococcus obscurus*. *Chromosoma*, 57: 333-340.
- Koh, T.L.; Khoo, G.; Fan, L.Q.; Phang, V.P.E. (1999). Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus (symphysodon ssp.)* as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 485-97.
- Kovács, B.; Egedi, S.; Bártfai, R.; Orbán, L. (2001). Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) *Genetica*, 110: 267-276.
- Kraemer, C. & Schmidt, E.R. (1993). The sex determination region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and Transposable elements. *Chromosoma*, 102: 553-562.
- Kuusipalo, L. (1999). Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*, 407: 141-48.
- Kuwada, Y. (1915). Ueber die chromosomenzahl von *Zea mays* L. *Bot. Mag.* 29: 83-89.
- Lamtsch, D.K.; Nanda, I.; Schlupp, I.; Epplen, J.T.; Schmid, M.; Scharl, M. (2004). Distribution and stability of supernumerary microchromosomes in natural populations of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 189-194.**
- Langdon, T.; Seago, C.; Jones, R.N. (2000). *De novo* evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics*, 154: 869-884.
- Leach, C.R.; Donald, T.M.; Franks, T.K. (1995). Organization and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichrosomatica*. *Chromosoma*, 103: 708-714.
- Leach, C.R.; Houben, A.; Timmis, J.N. (2004). The B chromosome in *Brachycome*. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 199-209.
- Levin, I.; Lyman, B.; Crittenden, L.B.; Dogson, J.B. (1993). Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics*, 16: 224-230.
- Li, Y.C.; Cheng, Y.M.; Hsieh, L.J.; Ryder, O.A.; Yang, F.; Liao, S.J.; Hsiao, K.M.; Tsai, F.J.; Tsai, C.H.; Lin, C.C. (2005). Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y-chromosome. *Chromosoma*, 114(1): 28-38.

Lin, B.Y. & Chou, H.P. (1997). Physical mapping of four RAPDs in the B chromosome of maize. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 534-538.

Liu, Z.J.; Li, P.; Argue, B.J.; Dunham, R.A. (1999). Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174: 59-68.

López-Fernandes, C.; Gosálvez, J.; Ferrucci, L.; Mezzanotte, R. (1991). Restriction endonucleases in the study of eukaryotic chromosomes. *Genetica*, 83: 257-274.

López-Leòn, M.D.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. (1991). Meiotic drive against an autosomal supernumerary segment promoted by the presence of a B chromosome in females of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cromosoma*, 100: 282-287.

López-Leòn, M.D.; Neves, N.; Schwarzacher, J.S.; Heslop-Harrison, J.S.; Hewitt, G.M.; Camacho, J.P.M. (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double fish technique. *Chromosome Research*, 2: 87-92.

López-Leòn, M.D.; Cabrero, J., Camacho, J.P.M. (1995a). Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome*, 38: 68-74.

López-Leòn, M.D.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. (1995b). Changes in DNA methylation during development in the B chromosome NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 74: 296-302.

Lorite, P.; Carrillo, J.A.; Garcia, M.F.; Palomeque, T. (2000). Chromosome numbers in spanish formicidae III. Subfamily Myrmecinae (Hymenoptera). *Sociobiology*, 36: 555-570.

Lowe-McConnell, R.H. (1969). Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol. J. Linn. Soc.*, 1: 51-75.

Lucov, Z. & Nur, U. (1973). Accumulation of B-chromosomes by preferential segregation in females of the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Cromosoma*, 42: 289-306.

Ludecke, H.J.; Senger, G.; Claussen, U.; Horsthemke, B. (1989). Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 338: 348-350.

Lyttle, T.W. (1991). Segregation disorders. *Ann. Rev. Genet.*, 25: 511-557.

Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Todedo, L.F. (1992). Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pices, Characiformes, characidae). *Genetica*, 87: 101-106.

Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1994a). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Rev. Bras. Genet.*, 17: 153-156.

Maistro, E.L.; Dias, A.L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (1994b). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B chromosomes. *Caryologia*, 47(3-4): 233-239.

Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998a). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Molec. Biol.*, 21: 201-206.

Maistro, E.L.; Mata, E.P.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998b). Unusual occurrence of a ZZ/ZW Sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genética*. 104: 1-7.

- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2000). Cytogenetic analysis of A and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restrictions enzyme banding na staining methods. *Genética*, 108: 119-125.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2001). Cytogenetic characterization of a supemumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 110: 177-183.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109: 161-168.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differenriated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 27: 536-542.
- Marchal, J.A.; Acosta, M.J.; Nietzel, H.; Sperling, K.; Bullejos, M.; Díaz de la Guardia, R.; Sánchez, A. (2004). X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chrom. Res.*, 12(8): 767-776.
- Margarido, V.P. & Galetti Jr., P.M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3): 569-573.
- Margarido, V.P. & Galetti Jr., P.M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 357-361.
- Martins, C.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (1996). Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios*, 85: 247-253.
- Martins, C. & Galetti Jr, P.M (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- Martins, C. (2005). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F. & Kapoor, B.G. Science Publisher, Inc.; USA.
- Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti Jr, P.M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127:133-141
- McAllister, B.F. (1995). Isolation and characterization of a retroelement from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nosonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 4: 253-262.
- McAllister, B.F. & Werren, J.H. (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106: 243-253.
- McQuade, L.R.; Hill, R.J.; Francis, D. (1994). B-chromosome systems in the greater glider, *Pteauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae). *Cytogenet. Cell Genet.*, 66: 155-161.
- Medeiros, L.R.; Rossa-Feres, D.C.; Jim, J.; Recco-Pimentel, S.M. (2006). B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 257-262.
- Meltzer, P.S.; Guan, X.Y.; Burgess, A.; Trent, J. (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their aplication. *Nat. Genet.*, 1: 24-28.

- Meltzer, P.S.; Guan, X.Y.; Su, A.S.; Gracia, E.; Trent, J.M. (1997). Identification of region specific genes by chromosome microdissection. *Cancer Genet. Cytogenet*, 93: 29-32.
- Messier, W.; Li, S.H.; Stewart, C.B. (1996). The birth of microsatellites. *Nature*, 381: 483.
- Mestriner, C.A.; Bertollo, L.A.C., Galetti Jr, P.M. (1995). Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a Sex sytem. *Chromosome Research*, 3: 440-443.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr, P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1-9.
- Miao, V.P.; Matthews, D.E.; VanEtten, H.D. (1991b). Identification and chromosomal locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Mol. Gen. Genet.*, 226: 214-223.
- Mizoguchi, S.M.H.N. & Martins-Santos, I.C. (1997). Macro and micro chromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 127: 249-253.
- Mizoguchi, S.M.H.N. & Martins-Santos, I.C. (1998). Cytogenetics and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazi. *Genet. Mol. Biol.*, 21:55-61.
- Molina, W.F.; Schmid, M.; Galetti Jr., P.M. (1998). Heterochromatin and sex chromosomes in neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios*, 94:1141-149.
- Moore, J.W. & Elder, R.L. (1965). Chromosome of the fox. *J. Hered*, 56: 142-143.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (1978). Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (PISCES, CHARACIDAE). *Ciência e Cultura Supl.*, 30: 548-549.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti, P.M. (1980). Evidences for multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 33: 83-91.
- Moreira-Filho, O. (1989). Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no "complexo" *Astyanax scabripinnis* (jenyns, 1842) (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Biológicas, universidade Federal de São Carlos. 135 pp.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1990). Uma técnica alternativa para preparações cromossômicas de peixes. *III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Resumos, p. 42.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Rev. Brasil. Genet.*, 14: 331-358.
- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Bertollo, L.A.C. (2001) Occurrence a metacentric macrochromosome B in different species the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 66: 59-64.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 230-234.
- Morelli, S.; Bertollo, L.A.C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Toledo Filho, S.A. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia*, 36: 235-244.

- Müntzing, A. (1944). Citological studies of extra fragment chromosomes in rye. I. Isofragments produced by misdivision. *Hereditas*, 30: 231-248.
- Nadig, S.G.; Lee, K.L.; Adams, S.M. (1998). Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. *Aquat Toxicol*, 43:163-78.
- Neo, D.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2000a). Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108: 211-215.
- Neo, D.M.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000b). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity*, 85: 136-141.
- Neusser, M.; Münchb, M.; Anzenbergerb, G.; Müllera, S. (2005). Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Genome Res.*, 108: 191-196.
- Nesbo, C.L.; Fossheim, T.; Vollestad, L.A.; Thomas, K. (1999). Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Mol. Ecol.*, 8: 1387-1404.
- Neves, N.; Barão, A.; Castilho, A.; Silva, M.; Morais, L.; Carvalho, V.; Viegas, W.; Jones, R.N. (1992). Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction. *Genome*, 35: 650-652.
- Nieves, M.; Mühlmann, M.; Mudry, M.D. (2005). Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genet. Mol. Res.*, 4(4): 675-683.
- Nishiyama, P.B. & Martins-Santos, I.C. (1996). Provável mecanismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW em duas espécies do gênero *Cheirodon* (Pisces, Cheirodontinae) do rio Paraná. Abstr. VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, p.26.
- Noda, S. (1975). Achiasmata meiosis in the *Fritillaria japonica* group. I. Different modes of bivalent formation in the two sex mother cells. *Heredity*, 34: 373-380.
- Nowak, R. (1994). Mining treasures from "junk DNA". *Science*, 263: 608-610.
- Nuntakarn, L.; Mevatee, U.; Withyachumnarnunkul, B.; Leardkamolkarn, V.; Fuchareon, S. (2002). Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*, 28: 1-9.
- Nur, U. (1963). A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma*, 14: 407-422.
- Nur, U. & Nevo, E. (1969). Supernumerary chromosome in the cricket frog, *Acris crepitans*. *Caryologia*, 22: 97-102.
- Nur, U. (1977). Maintenance of a "parasitic" B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics*, 81: 499-512.
- Nur, U. & Brett B.L.H. (1988). Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma*, 96: 205-212.
- Nur, U.; Werren, J.H.; Eickbush, D.G. (1988). A selfish B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science*, 240: 512-514.

- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Toledo Filho, S.A. (1988). Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Toledo-Filho, S.A. (1990). Comparative cytogenetic analysis in three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Cytologia*, 55: 21-26.
- Oliveira, C. & Foresti, F. (1993). Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios*, 76: 183-186.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Mori, L. ; Toledo Filho, S.A. (1993b). Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*, 46: 171-188.
- Oliveira, C.; Foresti, F.; Rigolino, M.G.; Tabata, Y.A. (1995). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae): the process of autosome and sex chromosome synapses. *Chromosome Research*, 3: 182-190.
- Oliveira, C.; Saboya, S.M.R.; Foresti, F.; Senhorini, J.A.; Bernardino, G. (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, 79: 473-476.
- Oliveira, C. & Wright, J.M. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilápia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205-211.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. (2000). Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, p. 24.
- Oliveira, C. & Nirchio, M. (2006). *Citogenética de peces*. Gráficas Internacional Porlamar, Estado Nueva Esparta, Venezuela. p 212.
- Orgel, L.E. & Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.
- Östergren, G. (1945). Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot Notiser*, 2: 157-163.
- Palestis, B.G.; Trvers, R.; Burt, A.; Jones, R.N. (2004). The distribution of B chromosome across species. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 151-158.
- Palomeque, T; Chica, E.; de la Guardia, R.D. (1990). Karyotype, G banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome*, 33, 267-272.
- Palomeque, T.; Chica, E.; Diaz de la Guardia, R. (1993). Supernumerary chromosome segments in different genera of Formicidae. *Genetica*, 90: 17-29.
- Pardo, M.C.; López-León, M.D.; Viseras, E. (1995). Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. *Heredity*, 74: 164-169.
- Pardo-Manuel de Villena, F. & Sapienza, C. (2001). Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. *Genetics*, 159: 1179-1189.
- Partis, L. & Wells, R.J. (1996). Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mol. Cell. Probes.*, 10: 435-41.
- Pauls, E. & Bertollo, L.A.C. (1983). Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36: 307-314.

- Pauls, E. & Bertollo, L.A.C. (1990). Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81: 117-123.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet. Genome Res.*, 112: 313-319.
- Peppers, J.A.; Wiggins, L.E.; Baker, R.J. (1997). Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, 5: 475-479.
- Perfectti, F. & Werren, J.H. (2001). The interspecific origin of B chromosome: experimental evidence. *Evolution*, 55(5): 1069-1073.
- Perfectti, F.; Corral, J.M.; Mesa, J.A. (2004). Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet Genome Res*, 106: 338-343.
- Phillips, R.B. & Reed, K.M. (2000). Localization of repetitive DNAs to zebrafish (*Danio rerio*) chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research*, 8: 27-35.
- Pigozzi, M.I. & Solari, A.J. (1998). Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromosome Res.*, 6: 106-113.
- Pinkel, D.; Straune, T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA*, 83: 2934-2938.
- Portela, A.L.B.S.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (1988a). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 11 (2): 307-316.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr., H.F.; Nishiyama, P.B. (2001). New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*, 110: 277-283.
- Portela-Castro, A.L.B. & Júlio Jr., H.F. (2002). Karyotype relations among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomy and Evolution Aspects. *Cytologia*, 67: 329-336.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E.L.; Foresti, F. (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 377-380.
- Postlethwait, J.H.; Johnson, S.L.; Midson, C.N.; Talbot, W.S.; Gates, M.; Ballinger, E.W.; Africa, D.; Andrews, R.; Carl, T.; Eisen, J.S.; Horne, S.; Kimmel, C.B.; Hutchinson, M.; Johnson, M.; Rodriguez, A. (1994). A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 264: 699-703.
- Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Júlio Jr., H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V.; Carrer, H.; Carraro, D.M.; Prioli, L.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 4, 421-430.
- Puertas, M.J. (2002). Nature e evolution of B chromosome in plants: a non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.*, 96: 198-205.

- Qi, L.X.; Zeng, H.; Li, X.L. (2002). The molecular characterization of maize B chromosome specific AFLPs. *Cell. Res.*, 12: 63-68.
- Randolph, L.F. (1928). Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.*, 41: 102.
- Rebollo, E.; Martin, S.; Manzanero, S.; Arana, P. (1998). Chromosomal strategies for adaptation to univalency. *Chromosome Res.*, 6: 515-531.
- Reed, K.M.; Bohlander, S.K.; Phillips, R.B. (1995). Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosome Res.*, 3: 221-226.
- Revaldaves, E. (2001). Variabilidade genética e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Rocon-Stage, E.A. & Almeida-Toledo, L.F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Rev. Bras. Genet.*, 16: 601-615.
- Roman, H. (1948). Directed fertilization in maize. *Proc. Natl. Acad. Sei USA*, 34: 36-42.
- Rubtsov, N.B.; Karamysheva, T.V.; Andreenkova, O.V.; Bochkaev, M.N.; Kartavtseva, I.V.; Roslik, G.V.; Borissov, Y.M. (2004). 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.*, 106: 289-294.
- Rutishauser, A. & Röthlisberger, E. (1966). Boosting mechanism of B chromosomes in *Crepis capillaris*. *Chromosomes Today*, 1. 28-30.
- Saitoh, Y. & Laemmli, U.K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 76(4): 609-22.
- Salvador, L.B. & Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69: 50-56.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sannomiya, M. (1974). Cytogenetic studies on natural populations of grasshoppers with special reference to B-chromosomes I. *Gonista bicolor*. *Heredity*, 32: 251-265.
- Sapre, A.B. & Desphande, D.S. (1987). Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.*, 78: 191-196.
- Senger, G.; Lüdecke, H.J.; Horsthemke, B.; Claussen, U. (1990). Microdissection of banded human chromosomes. *Hum. Genet.*, 114: 507-511.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Shapiro, J.A. & Sternberg, R. von (2005). Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biological Reviews*, 80: 227-250.
- Shapiro, J.A. (2005). A 21st century view of evolution: genome system architecture. Repetitive DNA and natural genetic engineering. *Gene*, 345 (1): 91-100.
- Sharbel, T.F.; Green, D.M.; Houben, A. (1998). B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome*, 41: 14-22

- Schartl, M.; Nanda, I.; Schlupp, I. (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*, 373: 68-71.
- Shimabukuro-Dias, C.K.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia*, 58(2): 102-111.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC-and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-113.
- Schmid, M.; Ziegler, C.G.; Steinlein, C.; Nanda, I.; Haaf, T. (2002). The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 97: 205-218.
- Schmid, M.; Ziegler, C.G.; Steinlein, C.; Nanda, I.; Schartl, M. (2006). Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research*, 14: 231-242.
- Schwarzacher, T. (2003). DNA, chromosome and *in situ* hybridization. *Gene*, 46: 953-962.
- Schueler, M.G.; Higgins, A.W.; Rudd, M.K.; Gustashaw, K.; Willard, H. (2001). Genomic and genetic definition human centromere. *Science*, 294:109-115.
- Schweizer, D. (1981). Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.*, 57: 1-14.
- Silva, M.J.J. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1998). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.*, 6: 455-462.
- Silvestro, M. & Margarido, V.P. (2001). Sistema de cromossomos sexuais X1X1X2X2/X1X2Y em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae) do alto Paraná, com a descrição de cromossomos supranumerários restritos ao sexo feminino. Abstr.47°.Congresso Nacional de Genética.
- Sobrinho, P.E. (2006). Caracterização Estrutural e Molecular dos Cromossomos Supranumerários de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Souza, I.L. & Moreira-Filho, O. (1995a). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60: 1-11.
- Souza, I.L. & Moreira-Filho, O. (1995b). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). II. Different cytotypes living in sympatry. *Cytologia*, 60: 273-281.
- Stark, E.A.; Connerton, I; Bennet, S.T. (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Res.*, 4: 15-23.
- Stein, J.; Phillips, R.B.; Devlin, R.H. (2001). Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenetic and Cell Genetics*, 92: 108-110.
- Stein, J.; Reed, K.M.; Wilson, C.C.; Phillips, R. (2002). A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. *Environmental Biol. of Fishes*, 64: 211-216.
- Stepien, C.A. & Kocher, T.D. (1997). Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Kocher, T.D.; Stepien, C.A.(eds.). *Molecular Systematics of fish*. New York: Academic Press. p.1-12.
- Stevens, N.M. (1908). The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. *J. Exp. Zool*, 5: 453-470.

- Stoecklein, N.H.; Erbersdobler, A.; Schmidt-Kittler, O.; Diebold, J.; Schardt, J.A.; Izbicki, J.R.; Klein, C.A. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am. J. Pathol.*, 161(1): 43-51.
- Stouthamer, R.; Van Tilborg, M.; Jong, J.H.; Nunney, L.; Luck, R.F. (2001). Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 617-622.
- Stripecke, R.; Nogueira-Pinto, M.T.; Hackel, C.; Sazima, I. (1985). O cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae), in XII Congresso Brasileiro de Zoologia (Campinas, Brazil).
- Sultmann, H.; Mayer, W.E.; Figueroa, F.; Tichy, H.; Klein, J. (1995). Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA makers. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 1033-1047.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner, A.T. (1990). *Chromosome banding*. Unwin Hyman. Inc., London, p 434.
- Taguchi, T.; Akimaru, K.; Hirai, H.; Hirai, Y.; Mwenda, J.M.; Taguchi, K.Y. (2003). A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Res.*, 11(2):147-52.
- Tanic, N.; Dedovic, N.; Vujosevic, M.; Dimitrijevic, B. (2000). DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome Research*, 10: 55-61.
- Thomas, J.H. (1995). Genomic imprinting proposed as a surveillance mechanism for chromosome loss. *Proc. Nat. L. Acad. Sci. USA*, 92: 5737-5741.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-80.
- Thorgaard, G.H. (1983). Chromosomal differences among *rainbow trout* populations. *Copéia*, 3: 650-662.
- Tosta, V.C.; Waldschmidt, A.M.; Brito, R.M.; Pompolo, S.G.; Salomão, T.M.F.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (1998). Marcadores RAPD ligados a Presença de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Genet. Moi. Biol.*, 21 (Suppl): 83.
- Tosta, V.C.; Waldschmidt, A.M.; Good-God, P.L.V.; Pompolo, S.G.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (1999). Uso de marcadores moleculares para o estudo de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.*, 22 (Suppl): 182.
- Tosta, V.C.; Fernandes-Salomão, T.M.; Tavares, M.G.; Pompolo, S.G.; Barros, E.G.; Campos, L.A.O. (2004). A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 279-283.
- Trask, B.J. (1991). Fluorescence *in situ* hybridization. *Trends Genet.*, 7: 149-154.
- Trifonov, V.A.; Perelman, P.L.; Kawada, S.I.; Iwasa, M.A.; Oda, S.I.; Graphodatsky, A.S. (2002). Complex structure B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonides* (Carnivora). *Chrom. Res.*, 10: 109-116.
- Uhl, C.H. & Moran, R. (1973). The chromosomes of *Pachyphytum* (Crassulaceae). *Am. J. Bot.*, 60: 648-656.

- Venere, P.C. & Galetti Jr, P.M. (1985). Natural triploidy na chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Rev. Brasil. Genet.*, 4: 681-687.
- Venere, P.C.; Miyazawa, C.S.; Galetti Jr, P.M. (1999). New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 345-349.
- Venkatesh, B. (2003). Evolution and diversity of fish genomes. *Curr. Opin Genet. Devel.*, 13: 588-592.
- Verma, R.S. & Babu, A. (1995). *Human Chromosomes. Principles and Technologies*. Nova Science Publishers, New York, USA.
- Vicente, V.E. (1994). Estudos do cromossomo B em três populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Vicente, V.E.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, characidae). *Cytogenet. Cell Genet.*, 74: 70-75.
- Vieira, M.M.R. (2001). Análise da evolução de populações locais de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes, Characidae) da região de Botucatu com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. p128.
- Viseras, E.; Camacho, J.P.M.; Cano, M.L.; Santos, J.L. (1990). Relationship between mitotic instability and accumulation of B chromosomes in males and females of *Locusta migratoria*. *Genome*, 33: 23-29.
- Volobujev, V.T. (1980). The B-chromosome system of mammals. *Genetica*, 52: 333-337.
- Volobujev, V.T. & Timina, N.Z. (1980). Unusually high number of B-chromosomes and mosaicism by them in *Apodemus peninsulares* (Rodentia, Muridae). *Tsitologiya Genet.*, 14: 43-45.
- Volubujev, V.T. (1981). B-chromosomes systems of the mammals. *Caryologia*, 34: 1-23.
- Vujosevic, M. (1993). B-chromosomes in mammals. *Genetica*, 25: 247-258.
- Vujosevic, M. & Blagojevic, J. (2004). B chromosomes in populations of mammals. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 247-256.
- Wasko, A.P. & Galetti Jr., P.M. (2002). RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii* genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hidrobiologia*, 474: 131-137.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Werren, J.H. (1991). The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Am. Nat.*, 137: 392-402.
- Wilkes, T.M.; Francki, M.G.; Langidge, P. (1995). Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, 3: 466-472.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

- Wilson, E.B. (1906). Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of genetic continuity of chromosomes. *J. Exp. Zool*, 6: 147-205.
- Wiltshire, R.N.; Dennis, T.R.; Sondak, V.K.; Meltzer, P.S.; Trent, J.M. (2001) Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 131(2):97-103.
- Write, M.J.D. (1973). *Animal cytology and evolution*. 3rd ed. London: Cambridge University Press.
- Wolf, K.W.; Mertl, H.G.; Traut, W. (1991). Structure mitotic and meiotic behavior and stability of centromere-like elements devoid of chromosome arms in the fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *Chromosoma*, 101: 99-108.
- Wurster-Hill, D.H.; Ward, O.G.; Davis, H.H.; (1988). Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf. and raccoon. *Cytogenet. Cell Genet.*, 49: 278-281.
- Zhang, R.X.; Chen, C.B.; Song, W.Q.; Li, X.L.; Chen, R.Y. (1999). Homologous analysis on centromeric region sequences of A and B chromosomes from rye by FISH. *Chinese Science Bulletin*, 44: 704-707.
- Zhang, F.Y.; Yin, W.B.; Shi, R.; Hu, Y.K.; Yan, Y.M.; Chen, Y.H.; Zhou, Y.H.; Hu, J., Wang, R.R.C.; Hu, Z.M. (2005). Construction and characterization of chromosome 1B specific DNA library of wheat. *Can. J. Plant. Sci.*, 85: 309-316.
- Ziegler, C.G.; Lamatsch, D.K.; Steinlein, C.; Engel, W.; Scharl, M.; Schmid, M. (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposons-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, 11: 23-35.
- Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; McKnight, T.D.; Nurul-Islam-Faridi, M.; Stella, D.M. (1997). A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. *Genome*, 40: 138-142.
- Zurita, S.; Cabrero, J.; López-León, M.D.; Camacho, J.P.M. (1998). Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution*, 52: 274-277.