

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**MESTRADO**

***Análise da Estrutura e Herança dos Cromossomos  
Supranumerários do Curimatá (*Prochilodus lineatus*) Coletados no  
Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP***

***Tatiana Aparecida Voltolin***

**BOTUCATU, 2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

***Tatiana Aparecida Voltolin***

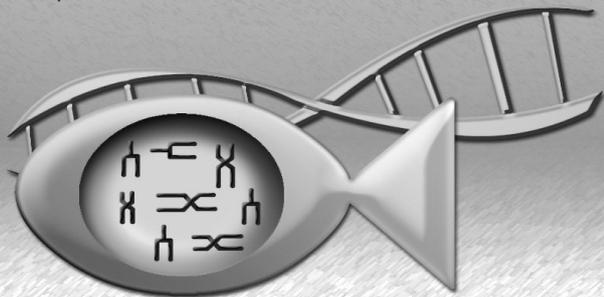
***Análise da Estrutura e Herança dos Cromossomos Supranumerários  
do Curimatá (*Prochilodus lineatus*) Coletados no Rio Mogi-Guaçu,  
Pirassununga, SP***

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

**Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti**

**BOTUCATU, 2008**

Laboratório de  
**Genética de Peixes**  
Unesp Bauru



*“Levantem os olhos sobre o mundo e vejam o que está acontecendo a nossa volta, para que amanhã não sejamos acusados de omissão, se o homem, num futuro próximo, solitário e nostálgico de poesia, encontrar-se sentado no meio de um parque forrado de grama plástica, ouvindo cantar um sabiá eletrônico, pousado no galho de uma árvore de cimento armado.”*

**Manoel Pedro Pimentel**

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

*Ao Nelson, pelo amor e carinho compartilhado em todos os momentos de nossa vidas.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 05/58867-3), pelo auxílio concedido.

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

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

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

Ao Laboratório de citogenética molecular (Centro de Nacional de Energia Atômica -Buenos Aires) pelo proveitoso estágio.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, pela oportunidade oferecida desde a Iniciação Científica, pela atenciosa orientação, pelo apoio, incentivo e confiança durante a realização deste trabalho e principalmente pelo seu dinamismo como pesquisador.

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

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

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

Aos amigos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP-Bauru: Aline, Álvaro, Ana, Carol, Diogo, Fernanda, Jake, Josi, Keila Paiva, Luiza, Nayara e Vanessa, pela harmoniosa convivência e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP-Botucatu, pela atenção e ajuda em diversas etapas deste trabalho.

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

Ao amigo Diogo, companheiro durante todos estes anos de existência do LaGenPe, pela valiosa ajuda e harmoniosa convivência compartilhada dia-a-dia.

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

A amiga e sempre amiga Sabrina, companheira em todas as horas, pelo apoio, amizade e pelo incentivo nas realizações pessoais e profissionais.

Aos meus pais, Waldemar e Ester, simplesmente por tudo, pela vida, pelos inigualáveis ensinamentos e por todo amor a mim dispensado onde quer que eu estivesse durante todos estes anos. Obrigada por fazerem parte de minha vida.

Ao Elvis, meu irmão, pelo apoio durante toda minha formação profissional.

Ao Nelson, meu namorado, por todo amor e compreensão e principalmente por estar ao meu lado durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimatá, é considerado uma espécie migradora por excelência. Endêmica dos rios sul-americanos, hoje representa a grande biomassa de peixes da bacia do Paraná, sobretudo nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. Sob o ponto de vista citogenético, apresenta um cariótipo bastante conservado exibindo um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos como número fundamental igual a 108. Um aspecto interessante nesta espécie é a presença de microcromossomos supranumerários ou B no seu conjunto cariotípico, que apresentam diferenciações de número e morfologia. Para esta espécie já foi registrada a presença de até 7 elementos extras, com variação inter e intra-individual. Os cromossomos B são considerados elementos adicionais presentes em alguns indivíduos de algumas espécies de plantas, fungos e animais e estudos intensivos têm sido realizados na busca de um melhor entendimento sobre a origem, estrutura e função destes elementos genômicos. Entretanto, o conhecimento sobre sua importância para a espécie portadora ainda é pouco significativo. Assim, com base na ocorrência de microcromossomos supranumerários em *P. lineatus* os principais objetivos deste trabalho foram buscar respostas elucidativas sobre a dinâmica evolutiva, herança, estrutura do DNA e origem destes elementos B nesta espécie. A caracterização citogenética dos exemplares de curimatás do rio Mogi-Guaçu realizada neste trabalho revelou um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, além da presença de até 7 cromossomos supranumerários, com número modal de 3 cromossomos B. A utilização de marcadores citogenéticos (Giemsa, NOR e Banda C) e citogenético-moleculares (FISH) com sondas de genes ribossômicos 5S e 18S confirmaram uma constituição cariotípica conservada para esta espécie. Não foram observados *clusters* adicionais referentes aos DNAr 5S e 18S. Para um melhor entendimento sobre a herança destes elementos extras no genoma desta espécie realizou-se um estudo do padrão de transmissão dos cromossomos B por meio de cruzamentos controlados. Estes cruzamentos foram realizados nas dependências do CEPTA/ICMbio, Pirassununga, SP. Análises citogenéticas da geração filial revelaram um comportamento meiótico regular para os elementos B, ou seja, o padrão de transmissão destes ( $K_B= 0,48$ ) foi consistente com a expectativa de segregação mendeliana, intimamente relacionada à neutralidade

dos elementos. A dinâmica evolutiva dos cromossomos B é caracterizada por rápidas invasões, seguidas de fases de neutralização, onde a frequência destes é estabilizada pela ação de genes supressores. Nesta fase, os elementos B promovem um processo de regeneração por meio de alterações nas seqüências de seu DNA, que desencadeia a formação de novas formas variantes que poderão substituir o B neutralizado, dando início a novas invasões. Este ciclo realizado pelos cromossomos supranumerários vem sendo observado ocorrer na população de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu. Diferenças observadas na morfologia e tamanho destes elementos extras poderiam estar relacionadas a modificações que estes elementos vêm sofrendo ao longo do processo evolutivo. Tais alterações podem desencadear a formação de novas variantes de B, as quais poderiam substituir o cromossomo B considerado ancestral, promovendo novos processos de invasão. O processo de invasão dos B no genoma desta espécie foi registrado no final da década de 70 e início da década de 80. Nos anos 90 e até os dias atuais, a frequência dos cromossomos B está passando por uma fase de neutralização, conforme dados levantados neste trabalho. Desta forma o padrão de herança mendeliana observado em cruzamentos realizados na piscicultura pode retratar fielmente a condição de neutralidades dos cromossomos B na população natural de curimatás deste rio. Diversos estudos têm sido realizados no intuito de identificar seqüências específicas de DNA nos cromossomos através da utilização de sondas. Com o objetivo buscar resposta sobre a origem e estrutura dos cromossomos B em peixes, foram elaboradas diversas sondas de DNA e até o momento, a metodologia empregada revelou sondas obtidas com o uso de enzimas de restrição. Neste trabalho foram elaboradas e utilizadas duas sondas a partir do genoma da espécie *P. lineatus*, sendo a PM1B uma sonda específica de cromossomo supranumerário obtida por meio da técnica de microdissecção cromossômica e a PG0B, obtida a partir do DNA total desta referida espécie. Com auxílio da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) estas sondas foram aplicadas em preparações cromossômicas de exemplares de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu. A sonda PG0B revelou um compartilhamento de seqüências de DNA entre os cromossomos A e B, principalmente nas regiões centroméricas e as evidências apresentadas são consistentes com a hipótese de que certos elementos estruturais são comuns para os cromossomos do complemento normal A e para os cromossomos B desta espécie. A sonda PM1B, entretanto, encontrou homologia apenas nos cromossomos

supranumerários. Assim, diferentes hipóteses podem explicar os resultados. Se tais elementos supranumerários tivessem sido originados a partir dos elementos A, os cromossomos supranumerários teriam seguido uma evolução independente e intensiva, determinando modificações profundas na seqüência de seu DNA. Por outro lado não se pode descartar a possibilidade de que estes elementos sejam originários de material genético completamente estranho à espécie, tendo sido nela introduzido por processos de hibridação interespecífica. Não pode ser descartada, contudo, a hipótese de que a falta de identidade entre os cromossomos do complemento A e os supranumerários poderia também ser decorrente de um processo de formação “de novo”, onde segmentos genômicos poderiam surgir em decorrência de processos fisiológicos normais das células.

Palavras-Chave: Cromossomo B; Evolução do Cromossomo B; Herança Mendeliana; *Prochilodus lineatus*; Citogenética de Peixes

## ABSTRACT

*Prochilodus lineatus*, popularly known in Brazil as curimatá, is considered a migratory species per excellence. This species is endemic in South American rivers, and today it represents the great fish biomass of Paraná Basin, above all in Grande, Pardo and Mogi-Guaçu rivers. In cytogenetic point of view, it presents a very conservative karyotype, exhibiting a diploid number of  $2n=54$  meta/submetacentric type chromosomes, with a fundamental number equal to 108. An interesting aspect in this species is the presence of supernumerary or B- microchromosomes in its karyotypic complex, which one differentiate in number and morphology. It has been already registered, for this species, the presence of up to 7 extra elements, ranging inter- and intra-individually. B-chromosomes are considered additional elements that are present in some species individuals of plants, fungi and animals. However, intensive studies have been carried out through the years, targeting a better understanding of these genomic segments. Nevertheless, little is known about its importance for bearer species. Based on *P. lineatus* supernumerary chromosomes occurrence, main objectives of this work were seek elucidative answers about evolutionary dynamics, inheritance, DNA structure and B-elements origin in this species. The accomplished cytogenetic characterization of Mogi-guaçu River curimatá exemplaries has shown a diploid number of  $2n=54$  meta/submetacentric type chromosomes, besides the presence of up to 7 supernumerary chromosomes, with a 3 B-chromosome modal number. Utilization of cytogenetical markers (Giemsa, NOR and C-Banding) and Cytogenetic-molecular (FISH) with 5S and 18S ribosomal gene probe has revealed a conserved karyotypic constitution. It was not observed additional clusters, in relation to 5S and 18S DNAr. For a better understanding about the extra elements inheritance in this species genome, a study about B-chromosomes transmission pattern by controlled cross was fulfilled. These cross were carried out at CEPTA/ICMbio, Pirassununga, SP. Filial generation cytogenetical analyses have demonstrated a meiotic behavior of B-elements, i.e., transmission pattern of these ones ( $KB= 0,48$ ) was consistent with mendelian expectation. This kind of mendelian inheritance presented in B-chromosomes is intimately associated with neutrality. B-chromosomes evolutionary dynamics is characterized by fast invasions followed by a neutralization stage, within they are stabilized by suppressor genes. In this stage, B-elements advance a regeneration process by alterations in its

DNA sequences. This regeneration triggers the formation of B new variants, which can replace neutralized B, initiating new invasions. This cycle, accomplished by supernumerary chromosomes, has been observed in Mogi-Guaçu river *Prochilodus lineatus* population. B invasion process in this species genome was registered on the late 70's and early 80's. In the 90's, and nowadays, B-chromosomes frequency is undergoing by a neutralization phase, which one can be confirmed by this study. In this way, mendelian inheritance pattern, observed in pisciculture realized cross, can faithfully depict B-chromosome neutrality condition on curimatá natural population of this river. Several studies have been carried out targeting to identify specific DNA sequences in chromosomes by probe utilization. Lots of probes were elaborated aiming a seek of some answers to fish B-chromosomes origin and structure. Nonetheless, so far, only probes got with restriction enzymes are known. In this work, two probes were elaborated from *P. lineatus* species genome, PM1B, a supernumerary chromosome specific probe got by chromosomal microdissection and PG0B, got from total DNA of the referred species. With the help of fluorescent in situ hybridization technique (FISH), these two probes, PM1B and PG0B, were used in chromosomal preparations of Mogi-Guaçu river *P. lineatus* exemplaries. With PG0B probe utilization, it was observed a DNA sequence compartment between A- en B-chromosomes, mainly at centromeric regions. This evidence is consistent with hypothesis of some structural elements are ordinary for A normal complement chromosomes and for B-chromosomes for this species. PM1B probe, however, has found homology only in supernumerary chromosomes. Thus, if such supernumerary elements had been originated from A-elements, these microchromosomes would have act on an intensive and independent evolution, determining profound modifications in their DNA. On the other hand, On the other hand if it cannot discard the possibility of that these elements are originary of completely strange genetic material to the species, having been in the introduced one for processes of interespecific hibridization. It cannot be discarded, however, the hypothesis of that the identity lack between the chromosomes of the complement and the supernumerary could also be recurrent of a process of formation "of new", where genomics' segments could appear in result of normal physiological processes of the cells.

Key Words: B-chromosome, B-chromosome evolution, mendelian inheritance, *Prochilodus lineatus*, Fish cytogenetics.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>02</b>
1.1 Características Gerais da Família Prochilodontidae.....	02
1.2 Características citogenéticas do gênero <i>Prochilodus</i> com ênfase em <i>Prochilodus lineatus</i> .....	06
2 Cromossomos Supranumerários.....	09
2.1 Origem dos cromossomos supranumerários.....	12
2.2 Dinâmica evolutiva dos cromossomos supranumerários .....	15
2.3 Cromossomos supranumerários em peixes .....	17
2.4 Cromossomos supranumerários em <i>Prochilodus</i> , com ênfase em <i>Prochilodus lineatus</i> .....	21
2.5 Estudo da estrutura dos cromossomos supranumerários em <i>Prochilodus</i> com ênfase Em <i>Prochilodus lineatus</i> .....	23
2.6 Objetivos .....	25
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Material .....	28
2.2 Local de Coleta e Manutenção da Espécie .....	29
2.3 Métodos .....	35
2.3.1 Estimulação de Mitoses.....	36
2.3.2 Preparação direta para obtenção de cromossomos metafísicos.....	36
2.3.3 Utilização de Marcadores Citogenéticos e Citogenético-Moleculares.....	40
2.3.3.1 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) através da Impregnação com nitrato de Prata (Ag-NO <sub>3</sub> ) (FISH).....	40
2.3.3.2 Caracterização da Heterocromatina Constitutiva.....	41
2.3.3.3 Localização Cromossômica por Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente .....	42
2.3.3.3.1 Microdissecção cromossômica e amplificação por DOP-PCR Estudos Cariotípicos .....	43
2.3.3.3.2 Obtenção da sonda genômica da espécie <i>Prochilodus lineatus</i> .....	46
2.3.3.3.3 Marcação do DNA pela técnica de <i>nick translation</i> .....	47
2.3.3.3.4 Hibridação .....	48
2.3.4 Estudos Cariotípicos.....	51
2.3.5 Marcação dos Exemplares.....	51
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
3.1 Capítulo 1 .....	56
3.2 Capítulo 2 .....	69
3.3 Capítulo 3 .....	81
3.4 Capítulo 4 .....	96
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>111</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>117</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Características Gerais da Família Prochilodontidae

A fauna de peixes neotropicais é extremamente rica, incluindo 71 famílias e 4.475 espécies descritas (Reis *et al.*, 2003). Entretanto uma estimativa em um mesmo estudo sugere a existência de aproximadamente 6.000 espécies nos rios e lagos da região neotropical. De acordo com Shaefer (1998) aproximadamente 8.000 espécies de peixes podem existir no neotrópico, correspondendo a aproximadamente 25% de todas as espécies existentes. Entretanto, a fauna de peixes de água continental do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies já descritas e existindo ainda, muitas desconhecidas (Buckup *et al.*, 2007).

Os Characiformes constituem um grupo dominante entre os peixes de água continental da América do Sul compreendendo formas herbívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas (Britisk *et al.*, 1972). Dentre os Characiformes destacam-se os peixes da família Prochilodontidae os quais podem ser considerados um dos componentes mais importantes da pesca comercial e de subsistência no ambiente neotropical da América do Sul (Castro & Vari, 2004). Desta forma, compreende espécies com importante participação na constituição da fauna dos rios neotropicais (Flecker, 1996). Os peixes desta família estão restritos em sua distribuição geográfica à América do Sul (Mago-Leccia, 1972; Britisk, 1972) com exceção do Chile, onde estas espécies não foram encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983).

A sistemática da família Prochilodontidae é um tanto complexa devido à extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a

distinção das diferentes espécies (Mago-Leccia, 1972). Esta homogeneidade e conservação dos caracteres taxonômicos pode ser explicada devido ao fato dessas espécies estarem amplamente distribuídas ao longo das grandes bacias hidrográficas da América do Sul, talvez por sua capacidade de efetuar grandes migrações com propósito reprodutivo, dispersando, dessa maneira, populações em grandes áreas (Mago-Leccia, 1972).

Todos os Prochilodontidae são iliófagos, possuindo assim algumas adaptações anatômicas como boca em forma de ventosa para succionar o lodo do fundo dos rios e retirar os detritos orgânicos. Apresentam tolerância ao ambiente em que vivem, tais como mudança de pH, estratificação de temperatura elevada e baixas concentrações de oxigênio (Mago-Leccia, 1972). Além disso, a família Prochilodontidae compreende espécies de tamanho variável alcançando mais de 50 centímetros de comprimento (Britski *et al.*, 1988). Castro & Vari (2004) mostraram que a família Prochilodontidae compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies).

O gênero *Prochilodus* é composto por espécies amplamente distribuídas em águas sul-americanas, sendo considerados peixes de relevante importância para o comércio e a pesca de subsistência (Mago-Leccia, 1972). Dentre todas as espécies deste gênero, *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimbatá é, certamente, a mais estudada. Considerado um animal endêmico da bacia Platina, apresenta uma alta capacidade migratória, sendo denominado peixe de piracema (Godoy, 1975). Embora sua ocorrência seja intensa durante a migração reprodutiva, exemplares desta espécie são capturados o ano todo em Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP (Godoy, 1975). Além disso, o curimbatá apresenta

elevado valor econômico pela facilidade de ser cultivado em rios, tanques e represas. Possui uma carne com alto valor protéico e perfeito balanço de aminoácidos essenciais (Lessi, 1968), também apresenta uma importância social para a pesca artesanal, de subsistência e esportiva (Barbieri *et al.*, 2004). Sua adaptação à criação e reprodução em cativeiro torna esta espécie altamente interessante para programas de piscicultura (Britski, 1972; Godoy, 1975; Castro, 1993). Neste aspecto, pesquisas relacionadas à reprodução induzida, manejo, técnicas de cultivo, alimentação e crescimento, têm sido realizadas de modo intensivo nas últimas décadas (Castagnolli & Cirino, 1980; Maiardes-Pinto *et al.*, 1984).

Um aspecto interessante em algumas espécies de peixes neotropicais é a capacidade de realizar extensas migrações. A migração pode ser definida como movimento resultante na mudança entre dois ou mais ambientes separados, ocorrendo com uma periodicidade regular e envolvendo grande parte da população (Northcote, 1984).

Variações no padrão de migração podem ocorrer, principalmente, devido a diferenças ambientais tais como mudanças na temperatura da água, concentração de CO<sub>2</sub>, fases da lua, entre outros (FAP 17, 1992). Peixes realizam deslocamentos no meio aquático durante as diferentes fases de sua vida e com objetivos variados. Muitas das espécies marinhas e de água doce, no entanto, não se deslocam e, por isso, permanecem ao longo de toda sua vida em um ambiente comparativamente restrito.

Os peixes de piracema, como são conhecidos no Brasil os que realizam migrações reprodutivas, apresentam padrões de deslocamento de alta complexidade (Godinho & Pompeu, 2003). Em razão dessa complexidade o estudo de padrões

migratórios de peixes brasileiros ainda é incompleto e muitas questões relativas ao tema ainda estão para serem respondidas (Godinho, 2007). Existem espécies de peixes que realizam extensivas migrações para a reprodução e/ou na busca de alimentos em quase todas as bacias da América Latina (Petrere, 1985; Quirós, 1988; Agostinho *et al.*, 2003).

Os trabalhos pioneiros de Godoy (1975) demonstraram que espécies de piracema do sistema dos rios Grande, Pardo, e Mogi-Guaçu deslocam-se do sítio de alimentação situado no rio Grande, onde permanecem durante um longo período do ano, até o sítio de desova no alto Mogi-Guaçu, num trajeto de aproximadamente 600 quilômetros.

Peixes do gênero *Prochilodus* são considerados os mais conspícuos, abundantes e dispersos entre os peixes neotropicais habitantes dos rios sul americanos, os quais fluem para o oceano Atlântico. Eles são migradores detritívoros que abastecem a atividade pesqueira em muitas partes do continente (Welcome, 1979). O hábito detritívoro faz dos *Prochilodus* um elemento dominante na estrutura trófica da comunidade aquática (Bowen, 1983; Flecker 1996). Nos últimos 40 anos, o alvo de experimentos e observações tem enriquecido uma extensiva documentação de movimentos anuais de grandes cardumes de *Prochilodus* juvenis e adultos (Bonetto & Pignalberi 1964; Godoy, 1967, Bayley 1973).

A maioria das informações sobre migrações de peixes na América do Sul é sobre o curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Godoy, 1959; 1962; 1967; 1972; 1987; Petrere, 1985; Sverlij *et al.*, 1993; Capeleti & Petrere, 2006). Segundo Godoy (1967) a migração de *P. lineatus* envolve, sobretudo, os três rios da bacia do rio Paraná, ou seja, rio Mogi-Guaçu, rio Pardo e rio Grande. Os curimatás apresentam alta capacidade migratória e estratificação quanto à distribuição de classes, comprimento

e grau de maturação, ou seja, os jovens permanecem nas lagoas de planície de inundações até atingirem a idade adulta, por volta dos dois anos, quando se juntam aos cardumes migrantes no período de reprodução que compreende os meses de setembro a março (Godoy, 1975; Sverlij *et al.*, 1993).

## **1.2 Características citogenéticas do gênero *Prochilodus* com ênfase em *Prochilodus lineatus***

Em uma análise geral, os dados citogenéticos disponíveis indicam que estes estudos estão concentrados principalmente na fauna de peixes neotropicais. Hoje, existem informações citogenéticas disponíveis para cerca de 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199 espécies não pertencentes à superordem Ostariophysi e 109 espécies de peixes marinhos (Oliveira *et al.*, 2006). Estes dados não incluem somente número e estrutura dos cromossomos, mas também informações quanto à presença de cromossomos sexuais, supranumerários e a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) (Almeida-Toledo *et al.*, 2000).

Em todas as espécies do gênero *Prochilodus* o número diplóide encontrado é  $2n=54$  cromossomos, permitindo inferir a ocorrência de uma evolução cariotípica predominantemente conservativa (Pauls & Bertollo, 1990). Dados citogenéticos analisados na espécie *Prochilodus lineatus* em diferentes populações demonstraram número diplóide de 54 cromossomos, sendo o cariótipo constituído por 40 do tipo metacêntrico e 14 do tipo submetacêntrico, com número fundamental igual a 108 (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho 2003; Artoni *et al.*, 2006). Além disso, os componentes destas

populações podem apresentar também de 0 a 7 microcromossomos supranumerários ou B no seu complemento cariotípico (Pauls e Bertollo, 1983; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000) que variam inter e intra-individualmente (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho 2003).

Artoni *et al.* (2006) ao estudar populações de *Prochilodus lineatus* da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, observaram indivíduos com um número diplóide de  $2n=54$  básico, além da presença de até 3 microcromossomos B.

Alguns trabalhos descritos na literatura relatam que a técnica de detecção da Região Organizadora de Nucléolo (NOR) por meio da impregnação por nitrato de Prata, marcam um único par de cromossomo portador da NOR (Pauls & Bertollo, 1990; Maistro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho, 2003; Artoni *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006). Tais Regiões Organizadoras de Nucléolo são facilmente detectadas pela impregnação por nitrato de Prata, sendo extensivamente utilizada em diversos organismos. Entretanto, uma limitação apresentada pelo uso desta técnica refere-se ao fato de que a Prata não se liga às regiões de DNAr, mas sim às proteínas associadas a estrutura nucleolar, limitando-se a identificar somente as NORs que estiverem ativas na intérfase precedente (Miller *et al.*, 1976). Diante deste contexto, localização das NORs por meio da hibridização isotópica ou não isotópica com sondas RNAr ou DNAr em fixações cromossômicas tem sido uma técnica bastante eficiente na localização e investigação de genes ribossomais (Long & Dawid, 1980).

O conhecimento sobre identificação e localização cariotípica dos genes ribossomais 18S e 5S por meio da técnica de FISH (Hibridação *in situ* Fluorescente) no genoma de espécies da família Prochilodontidae é ainda bastante restrito (Jesus & Moreira-Filho, 2003). A localização *in situ* de genes ribossomais indicaram sintonia para os sítios 18S e 5S DNAr em *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus argenteus*

assim como polimorfismos no número de genes 18S (Jesus & Moreira-Filho, 2003; Hatanaka & Galetti Jr., 2004).

Segundo Jesus & Moreira-Filho (2003), não foram encontrados *clusters* DNAr 5S ou DNAr 18S localizado nos microcromossomos B de *Prochilodus lineatus*, embora alguns estudos tenham descrito a ocorrência de *clusters* de DNAr 18S nestes cromossomos (Lopez-Lopez *et al.*, 1994).

Utilizando ainda a técnica de FISH, foram relatados em *P. lineatus* a localização cromossômica das famílias satélites SATH1 e SATH2, onde mostrou que SATH1 está presente em um conjunto maior de cromossomos A do que a família SATH2. Além disso, as seqüências SATH1 estão presentes em todos os cromossomos B, enquanto que as SATH2 estão ausentes nestes (Jesus *et al.*, 2003).

Vários estudos de bandamento C têm sido realizados em representantes da família Prochilodontidae principalmente na espécie *P. lineatus*. As análises em preparações cromossômicas de curimbatá evidenciaram a presença de heterocromatina constitutiva principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos autossômicos (Maistro *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2006; Artoni *et al.*, 2006). Os cromossomos supranumerários dessa espécie se caracterizam como inteiramente heterocromáticos (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006). Entretanto, a espécie *P. lineatus* proveniente da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, apresentaram um pequeno segmento de banda C negativo na região pericentromérica de um cromossomo B metacêntrico (Artoni *et al.*, 2006).

## 2 Cromossomos Supranumerários

Os cromossomos supranumerários têm sido descritos em mais de 1300 espécies de plantas e quase 500 espécies de animais (Jones & Rees, 1982; Jones & Puertas, 1993; Jones, 1995), além de várias espécies de fungos (Mills & McCluskey 1990; Miao *et al.*, 1991 a,b; Tzeng *et al.*, 1992; Gêiser *et al.*, 1996; Leclair *et al.*, 1996).

Muitas hipóteses têm sido postuladas no intuito de buscar uma possível definição para cromossomos supranumerários. Segundo Camacho *et al.* (2000) os cromossomos B seriam cromossomos adicionais, dispensáveis os quais estão presentes em alguns indivíduos de determinadas espécies e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, porém não seguindo seu caminho evolutivo.

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

Os cromossomos supranumerários são freqüentemente heterocromáticos e geralmente não apresentam homologia com os cromossomos do complemento normal (A), podendo variar tanto em número quanto em morfologia (Jones, 1991). Devido a sua natureza heterocromática, são considerados praticamente inertes, podendo conter um número relativamente pequeno de genes ou cístrons ativos (Jesus *et al.*, 2003).

Um estudo detalhado permitiu a Jones (1991) caracterizar os cromossomos supranumerários ou B e diferenciá-los dos cromossomos A por apresentarem algumas características específicas:

Não são cromossomos essenciais e, portanto, podem se apresentar em alguns indivíduos de uma população ou não; não possuem homólogos, ou seja, nunca emparelham entre si e nem com os cromossomos do complemento normal. Portanto, não apresentam homologia com os cromossomos do complemento padrão; são encontrados em organismos diplóides e poliplóides; apresentam frequência variável não só entre diferentes populações, como também inter e intra-individualmente; são morfológica e estruturalmente diferentes dos elementos do grupo (A), sendo geralmente menores que estes; são geneticamente inativos como no milho, onde nunca aparecem nos mapas de ligação; a qualidade de seu DNA não parece ser muito diferente daquela do genoma normal (A); mostram herança não mendeliana, como resultado de uma instabilidade mitótica e meiótica e de vários modos de deriva; em cruzamentos experimentais em muitas espécies eles são transmitidos com uma frequência mais alta que a esperada, conduzindo a um acúmulo na progênie; sua significância adaptativa nas populações é desconhecida, apesar de várias tentativas de ligá-los a variações fenotípicas e do meio ambiente. Enfim, a origem dos cromossomos B é ainda controversa.

Dois modelos são propostos para explicar a manutenção dos B em populações naturais: o modelo heterótico e o modelo parasítico. De acordo com o modelo heterótico proposto por White (1973), os cromossomos B seriam mantidos graças às vantagens adaptativas que conferem aos seus portadores quando se encontram em números baixos. Já o modelo parasítico proposto é discutido por vários autores (Östergren, 1945; Nur, 1966 a, b; Nur, 1977; Jones, 1985; Shaw &

Hewitt, 1990) que consideram que os cromossomos B permanecem nas populações em razão de seus próprios meios de acúmulo. Nesta segunda hipótese, esses cromossomos se apresentariam como elementos parasitas, uma vez que sua presença não traria vantagem aos seus portadores.

Segundo Volobujev (1981), os cromossomos B podem ser classificados em três categorias de acordo com seu tamanho em relação aos cromossomos A. O primeiro grupo consiste de cromossomos B cujo tamanho é menor do que os menores cromossomos do complemento normal A; o segundo grupo consiste de cromossomos B equivalentes em tamanho ao dos menores cromossomos do complemento padrão A; e no terceiro grupo, os cromossomos supranumerários podem ser maiores que os maiores cromossomos do complemento A.

Geralmente, a maioria dos genes contidos nos cromossomos B não se expressam. Entretanto, quando ativos, podem afetar características quantitativas para os indivíduos portadores, especialmente associadas com o vigor, sobrevivência, fecundidade e fertilidade (Camacho *et al.*, 2000). Estes efeitos são freqüentemente deletérios, embora existam alguns exemplos de cromossomos B com efeitos benéficos quando presentes em pequeno número (Jones & Rees, 1982). Muitos cromossomos B têm sido encontrados portando genes ribossomais (Green 1990; Beukeboom, 1994; Jones, 1995), embora na sua maior parte eles sejam inativos (Donald *et al.*, 1997). Alguns efeitos dos cromossomos B parecem ser atribuídos diretamente ao produto de seus genes, como no caso de genes que controlam a resistência para ferrugem nos cromossomos B de *Avena sativa* (Dherawattana & Sadanaga, 1973) e genes que conferem a resistência a antibióticos em cromossomos B do fungo *Nectria haematococca*, favorecendo esta patogenicidade (Miao *et al.*, 1991a). Estes exemplos indicam que nem todos os cromossomos B são

geneticamente inativos. Entretanto, mais informações tornam-se necessárias para alicerçar a opinião mais aceita de que a maioria dos cromossomos B não apresenta um grande número de genes ativos (Camacho *et al.*, 2000).

## 2.1 Origem dos Cromossomos Supranumerários

Existem muitas teorias a respeito da origem dos cromossomos B. Duas hipóteses gerais têm sido propostas para elucidar tal origem. Na primeira, hipótese de origem intra-específica (Jamilena *et al.*, 1994a, 1995b; Houben *et al.*, 1996; Peppers *et al.*, 1997; Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000), os cromossomos B surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. Por exemplo, um cromossomo B poderia se originar do próprio conjunto polissômico dos cromossomos A, a partir de fragmentos cênicos resultantes da fusão de cromossomos A ou da amplificação da região paracentromérica de fragmentos de cromossomos A. Uma clara evidência que favorece esta hipótese foi obtida por Keyl & Hagele (1971) quando demonstraram que os padrões de bandas nos cromossomos B de *Chironomus plumosus* eram similares a encontrada próxima ao centrômero do quarto par cromossômico autossômico. Na segunda hipótese, da origem interespecífica (Sapre & Deshpande, 1987; Eickbush *et al.*, 1992; McVean, 1995; Scharl *et al.*, 1997; Camacho *et al.*, 2000; Perfectti & Werren, 2001), os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização. A origem do cromossomo B como decorrência de processo de hibridização foi comprovada por Perfectti & Werren (2001) ao observarem a presença de cromossomos supranumerários em uma linhagem de vespas do gênero

*Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre duas espécies diferentes, *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

Antes destas duas teorias sobre a origem dos cromossomos supranumerários serem conhecidas, Volobujev (1981) postulou duas hipóteses para explicar a origem destes elementos genômicos. A primeira propunha que os cromossomos B poderiam ser relíquias de rearranjos estruturais que ocorreram durante a evolução de um cariótipo ancestral. A outra teoria supunha que estes cromossomos poderiam resultar de processos de não-disjunção cromossômica dos cromossomos sexuais ou autossômicos, seguidos por um processo de inativação genética. Esta segunda suposição pode ser relatada a partir do trabalho realizado por Salvador & Moreira-Filho (1992) ao identificarem cromossomos supranumerários entre os componentes uma população de *Astyanax scabripinnis*, proveniente do município de Campos do Jordão. A origem deste elemento genômico nesta população estudada poderia estar associada a não-disjunção mitótica do par cromossômico 1 durante a divisão celular, seguido por um processo de heterocromatização comprovado pela técnica de bandamento C.

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

Segundo Camacho *et al.* (2000), a caracterização molecular da seqüência de DNA repetitivo específica para cromossomos B e que são compartilhadas também por cromossomos A de outras espécies, fornecem subsídios que reforçam a hipótese de origem intra-específica para estes elementos genômicos. Os cromossomos sexuais também têm sido previamente propostos como ancestrais dos cromossomos B desde que eles possam ser tolerados no estado polissômico (Hewitt 1973). Um exemplo de cromossomo sexual que pode ter originado um cromossomo B é o caso do cromossomo B<sub>2</sub> do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, onde o rearranjo de duas seqüências repetitivas de DNA em seu respectivo centrômero coincide especificamente com a do cromossomo X (López-León *et al.*, 1994). Isto sugere que o cromossomo B de *E. plorans* tenha sido derivado da região paracentromérica do cromossomo X, com subsequente amplificação de dois tipos de seqüências contidas nele (Camacho *et al.*, 2000). Contudo, hipóteses alternativas sobre a origem dos cromossomos B têm surgido em decorrência do conhecimento da estrutura molecular da identidade de fragmentos livres de DNA de origem não cromossômica, comumente encontrado nos núcleos das células. A hipótese de que estes segmentos genômicos supranumerários tenham surgido “*de novo*” a partir de processos de construção e desmanche de segmentos genômicos nucleares, em um processo fisiológico normal das células num modelo de desenvolvimento independente, não pode ser descartada (Foresti, 1998). Diante disso, pode-se concluir que os cromossomos supranumerários parecem não apresentar um modelo de origem comum, ou seja, podem ter se originado de forma independente e seguindo diferentes caminhos evolutivos.

## 2.2 Dinâmica evolutiva dos cromossomos supranumerários

De acordo com a presença de mecanismos de acumulação dos cromossomos supranumerários e seus possíveis efeitos, dois modelos de equilíbrio podem ser mencionados, o modelo heterótico e o parasítico (Rosetti *et al.*, 2006). O modelo heterótico aponta um balanço entre os efeitos positivos dos cromossomos B nas formas hospedeiras quando eles ocorrem em baixo número e efeitos negativos quando eles ocorrem em alto número. Entretanto, este modelo não contempla um mecanismo de acumulação (White, 1973). O modelo parasítico proposto por Östergren, (1945); Nur, (1966a,b, 1977), ou modelo egoísta, definido por Jones (1985); Shaw & Hewitt, (1990), é considerado o mais comum entre os organismos portadores. Este modelo assume que os cromossomos B são mantidos na população por meio de mecanismos de acumulação, o qual contrabalança os efeitos deletérios destes segmentos no genoma hospedeiro.

A dinâmica evolutiva dos cromossomos B parasitas parece ser caracterizada por rápidas invasões em virtude do acúmulo, seguida por neutralização por meio da evolução de genes supressores presentes nos cromossomos A, os quais eliminam os efeitos do acúmulo de B (Camacho *et al.*, 1997). No modelo proposto por estes autores, o acúmulo de cromossomos B pode proporcionar um marcante aumento da frequência, em uma determinada população, em apenas 10 gerações.

O acúmulo dos cromossomos B nas populações portadoras depende de duas importantes propriedades, definidas como o efeito no genoma hospedeiro e seu padrão de transmissão (Camacho *et al.*, 2000). Vários efeitos são teoricamente possíveis diante da interação destas duas propriedades. Está claro que a origem dos cromossomos B relaciona-se aos mecanismos de acumulação e a proliferação e

somente pode ser explicada em termos de efeitos benéficos proporcionados à população hospedeira. Estas são as formas pelas quais estes cromossomos podem aumentar sua frequência e estabelecer polimorfismos na população natural. O comportamento meiótico irregular pode auxiliar na fixação dos cromossomos B. Entretanto, se o padrão de transmissão estiver abaixo da expectativa mendeliana, estes são destinados à extinção por meio de forças ao acaso (Camacho *et al.*, 2000).

Recentemente, um modelo de não equilíbrio de evolução dos cromossomos B a longo prazo foi proposto por Zurita *et al.* (1998). De acordo com este modelo, um cromossomo B parasítico, tendo perdido seu mecanismo de acumulação é destinado a desaparecer rapidamente, lentamente ou muito lentamente da população, em um longo processo de extinção ao acaso alcançando o estágio de neutralização. Diante disso, uma nova variação de cromossomo B pode aparecer e reiniciar o ciclo (Herrera *et al.*, 1996).

Um exemplo clássico do surgimento de novas variantes de cromossomos B foi registrado na população de gafanhoto *Eypreponemis plorans*. Os cromossomos B desta espécie são considerados bastante mutáveis (Camacho *et al.*, 1997). Diferentes tipos de cromossomos B foram descritos em ocasião da translocação entre os cromossomos A e B (Henriques-Gil *et al.*, 1984; Henriques-Gil e Arana, 1990) e a freqüente geração de uma nova variante de B (López-Léon *et al.*, 1994) indica que o polimorfismo é muito dinâmico nesta população. A nova variante apresenta um acúmulo de sua frequência, aumentando a média do número de B por indivíduo (Camacho *et al.*, 1997).

### 2.3 Cromossomos Supranumerários em Peixes

Os cromossomos B são encontrados em aproximadamente 40 espécies de peixes neotropicais de diferentes táxons, compreendendo cerca de 1,5% das espécies de peixes com cariótipos analisados (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Oliveira *et al.*, 1997).

Uma das primeiras descrições de supranumerários com características pertinentes aos cromossomos B em peixes da região Neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus* por Pauls & Bertollo (1983). Entretanto, muitas outras espécies de peixes de diferentes gêneros e ordens têm apresentado cromossomos supranumerários em seus cariótipos (Moreira-Filho *et al.*, 2001).

A ocorrência de cromossomos B entre os indivíduos de uma população pode ser esporádica, ou ser comumente encontrada para muitas espécies, podendo mostrar uma alta frequência entre os indivíduos. É possível encontrar também variações em relação à morfologia, tamanho e número desses supranumerários (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Venere *et al.*, 1999; Cavallaro *et al.*, 2000; Fernandes & Martins-Santos 2005; Artoni *et al.*, 2006).

Morfologicamente, os cromossomos supranumerários podem diferir entre os indivíduos de uma mesma espécie. Fernandes & Martins-Santos (2005) ao analisarem citogeneticamente exemplares de *Astyanax scabripinnis* do córrego Tatupeba, bacia do rio Ivaí, encontraram três citótipos distintos referentes à presença de cromossomos supranumerários. No primeiro citótipo os indivíduos exibiam um macrocromossomo B do tipo metacêntrico totalmente heterocromático, no segundo citótipo os animais portavam macrocromossomos B do tipo metacêntrico,

submetacêntrico e acrocêntrico, sendo que estes se apresentaram parcialmente heterocromáticos e no terceiro citótipo, os exemplares apresentaram macrocromossomos B dos tipos metacêntrico e acrocêntrico parcialmente heterocromáticos.

Em populações de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu os microcromossomos B mostraram diferentes formas, apresentando-se como metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos, sendo a forma metacêntrica a mais freqüente (Artoni *et al.*, 2006).

Com relação ao tamanho, os cromossomos supranumerários exibem uma notável variação, ou seja, existe a ocorrência de macrocromossomos como nas espécies do gênero *Astyanax* (Maistro, *et al.*, 1992; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Vicente *et al.*, 1996; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, no prelo); cromossomos supranumerários de tamanho médio, como em *Rhamdia* (Fenocchio & Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000) ou microcromossomos, como em *Prochilodus* (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Venere *et al.*, 1999; Cavallaro *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003).

Os cromossomos B também podem variar em número nas espécies portadoras. Os microcromossomos B presentes em indivíduos da espécie *P. lineatus* apresentaram um variação de até 7 cromossomos supranumerários (Pauls & Bertollo, 1983; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000). Foresti *et al.* (1989) detectaram a presença de até 8 pequenos cromossomos supranumerários em *Moenkhausia sanctaefilomenae* e Oliveira & Foresti (1993) descreveram a ocorrência de até 2 microcromossomos metacêntricos adicionais na espécie *Steindachnerina insculpta* (Curimatidae).

Em espécies do gênero *Astyanax* também foram encontradas variações quanto ao número de cromossomos supranumerários. Os macrocromossomos B de *Astyanax scabripinnis* têm sido estudados mais intensamente nos anos recentes, desde as investigações iniciais de Salvador & Moreira-Filho (1992) e Maistro *et al.* (1992). A maioria dos exemplares estudados apresentaram uma variação de até 1 macrocromossomo B metacêntrico. A ocorrência de 2 cromossomos B apresenta-se como uma condição rara nesta espécie. (Vicente *et al.*, 1996).

Fenocchio & Bertollo (1990), em estudo citogenético realizado em *Rhamdia hilarii* demonstraram que o número cromossômico desta espécie era de  $2n=58$ , existindo uma variação numérica no cariótipo dos exemplares analisados, com indivíduos apresentando até  $2n=63$  cromossomos. Esta variação foi atribuída à presença de cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis nesta espécie.

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

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

Ao estudarem a espécie *Astyanax scabripinnis*, Mestriner *et al.* (2000) e Néo *et al.* (2000a), detectaram por meio de bandamento C a presença de seqüências repetitivas em ambos os braços do cromossomo B, de modo semelhante ao par 24 do conjunto cromossômico (A), reforçando, desta forma, argumentos favoráveis sobre a hipótese de origem destes macrocromossomos extras a partir de isocromossomos.

Salvador & Moreira-Filho (1992) realizaram o estudo da origem dos cromossomos supranumerários em uma população de *Astyanax scabripinnis*, proveniente do município de Campos do Jordão e segundo estes autores, o elemento B nesta população poderia estar associado a não-disjunção mitótica do primeiro par cromossômico durante a divisão celular seguida por um processo de heterocromatização comprovado pela técnica de bandamento C.

Porto-Foresti *et al.* (1997) analisaram a ocorrência de cromossomos supranumerários na espécie *Astyanax scabripinnis paranae* em três trechos distintos do córrego Cascatinha, um pequeno tributário do rio Tietê, Botucatu, SP, onde o primeiro trecho analisado correspondia à cabeceira deste córrego localizado a 880 metros acima do nível do mar, o segundo trecho compreendia o curso médio do córrego, a 860 metros acima do nível do mar e o terceiro trecho correspondia ao final do curso do córrego antes de desaguar no rio Tietê com 820 metros de altitude.

As análises dos exemplares desta espécie coletados nestas três localidades apresentaram um número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, além da presença de um macrocromossomo extra em 60% dos animais provenientes do primeiro trecho analisado, enquanto nos demais trechos a freqüência foi cerca de 30%. Considerou-se que as condições ambientais poderiam conferir uma vantagem seletiva para os

peixes habitantes da cabeceira deste córrego em relação aos peixes dos dois outros trechos.

Estudos realizados em três populações de *Astyanax scabripinnis* provenientes de localidades em diferentes altitudes de um mesmo riacho na região de Campos do Jordão, SP, revelaram a presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920 metros e 1800 metros), e sua ausência na população de baixa altitude (700 metros) (Néo *et al.*, 2000b). Portanto a presença destes elementos poderia ser determinada por características ambientais favoráveis para a espécie (Néo *et al.*, 2000b). Contudo, com relação aos microcromossomos B ainda não há descrição de casos que favoreçam a aceitação e aplicação de uma hipótese adaptativa (Alves & Martins-Santos, 2002).

#### **2.4 Cromossomos Supranumerários em *Prochilodus*, com ênfase em *Prochilodus lineatus***

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

Uma interessante característica de algumas espécies do gênero *Prochilodus* é a presença de microcromossomos supranumerários, que foi primeiramente descrita em *Prochilodus lineatus* por Pauls e Bertollo (1983). Nesta espécie, os cromossomos B puderam ser facilmente identificados como microcromossomos heterocromáticos, com frequência variável de até 7 elementos inter e intra-individualmente (Pauls & Bertollo, 1983; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003). Posteriormente, microcromossomos B foram identificados também em *Prochilodus brevis* (= *P. cearensis*) por Pauls & Bertollo (1990). Além de apresentar todas as características dos cromossomos B de *P. lineatus*, a espécie *P. brevis* apresentou uma variação de 0 a 2 microcromossomos B. Venere *et al.* (1999) descreveram a ocorrência de cromossomos B na espécie *Prochilodus nigricans* coletados no rio Araguaia, sendo que um entre três exemplares analisados apresentou 2 microcromossomos supranumerários, os quais foram considerados totalmente heterocromáticos após o bandamento C. Recentemente, Oliveira *et al.* (2003) identificaram a presença de até 3 cromossomos supranumerários em alguns indivíduos da espécie *Prochilodus mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

Vários estudos (Pauls & Bertollo, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003, Artoni *et al.*, 2006) têm mostrado que a espécie *P. lineatus* é um dos modelos de peixes neotropicais mais utilizado para estudos concernentes à origem, comportamento e evolução dos cromossomos B. Este fato pode estar associado à facilidade de captura e reprodução em cativeiro que esta espécie apresenta (Oliveira *et al.*, 1997).

Os cromossomos B em peixes geralmente se apresentam heterocromáticos quando submetidos ao bandamento C. Análises realizadas em preparações

cromossômicas de indivíduos da espécie *P. lineatus* oriundos do rio Mogi-Guaçu confirmaram a presença de cromossomos B totalmente heterocromáticos (Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho, 2003; Artoni *et al.*, 2006).

Artoni *et al.* (2006) ao caracterizarem a espécie *Prochilodus lineatus* da lagoa Dourada na bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa no Estado do Paraná, Brasil, observaram pequenos segmentos Banda C negativos na região pericentromérica de um cromossomo B metacêntrico .

## **2.5 Estudo da Estrutura dos Cromossomos Supranumerários em *Prochilodus***

Pouco é conhecido sobre a composição molecular do DNA satélite presente especificamente nos cromossomos supranumerários de peixes (Jesus *et al.*, 2003). Os cromossomos B usualmente não se recombinam com os cromossomos do complemento padrão A seguindo aparentemente um processo de evolução independente (López-Léon *et al.*, 1994; Camacho *et al.*, 2000).

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

acumulação de algumas modificações na sua estrutura durante seu processo evolutivo (Maistro *et al.*, 2000).

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

O desenvolvimento metodológico da Biologia Molecular nas últimas décadas possibilitou a amplificação de qualquer segmento de DNA através da aplicação de técnicas como o DOP-PCR (DNA Degenerate Oligonucleotide-Primed), trazendo grandes avanços na aplicação da citogenética molecular em muitos campos até então inexplorados. A construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvida a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992) tem sido amplamente utilizada em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, esta metodologia começou a ser direcionada recentemente para estudos cromossômicos

em peixes que até então eram realizadas com o emprego de enzimas de restrição (Diniz, 2007). Considera-se, a identificação de outras seqüências repetitivas no genoma dos *Prochilodus*, por meio da técnica de microdissecção cromossômica desencadeará uma melhor caracterização molecular e cromossômica destas espécies, buscando esclarecimentos sobre sua origem, estrutura e sobre a herança deste tipo de cromossomos.

## 2.6 Objetivos

Tendo em vista a ocorrência de cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* nas populações naturais existentes no rio Mogi-Guaçu, os objetivos gerais deste trabalho visaram realizar estudos sobre a dinâmica evolutiva, herança, estrutura e possível origem destes elementos genômicos, com base na caracterização citogenética desta espécie. Assim este estudo teve como principais objetivos:

- 1) caracterizar a espécie *Prochilodus lineatus* por meio da utilização de marcadores citogenéticos (Giemsa, NOR e Banda C), e citogenéticos-moleculares (FISH) com a utilização de sondas dos genes ribossomais DNAr 5S e DNAr 18S;
- 2) efetuar cruzamentos dirigidos entre os indivíduos dos estoques reprodutores da espécie *P. lineatus* mantidos para cultura, a fim de analisar o padrão de transmissão dos cromossomos B para esta espécie, fornecendo informações sobre a importância e viabilidade do uso de cruzamentos controlados na compreensão do processo de manutenção dos cromossomos B desta espécie nas populações selvagens;

- 3) avaliar a frequência dos cromossomos supranumerários na população natural de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, buscando, desta forma, informações sobre a dinâmica evolutiva destes elementos genômicos nesta espécie;
- 4) buscar informações sobre a estrutura, composição e origem dos cromossomos supranumerários na espécie *P. lineatus* por meio da utilização de sondas obtidas a partir da técnica de microdissecção cromossômica do DNA total da espécie e de seus respectivos cromossomos supranumerários;
- 5) contribuir com informações para o entendimento do papel desempenhado pelos cromossomos B no genoma dos peixes e, de modo mais amplo, nos vertebrados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

A espécie estudada, *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimatã, pertence à ordem Characiformes e à família Prochilodontidae. Os peixes desta família atingem um tamanho médio de aproximadamente 50 centímetros apresentando um corpo largo, comprido e recoberto por escamas médias ou pequenas. Possuem espinho pré-dorsal e bífido. A boca é subterminal, geralmente pequena, proctátil e provida de lábios grossos (Godoy, 1975). Compõem taxonomicamente a família Prochilodontidae 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies) (Castro & Vari, 2004).

Dentre todas as espécies destes gêneros, *P. lineatus* (Figura 1), é certamente, a mais estudada. Considerado um animal endêmico da Bacia Platina, apresenta uma alta capacidade migratória, sendo denominado um migrador por excelência (Godoy, 1975; Sverlij *et al.*, 1993). Embora a constatação da sua ocorrência seja mais intensa durante a atividade de migração reprodutiva, que ocorre freqüentemente entre os meses de outubro a março, exemplares desta espécie podem ser capturados praticamente durante o ano todo em Cachoeiras de Emas, município de Pirassununga, SP (Godoy, 1975).



**Figura 1.** Exemplar da espécie de curimatá (*Prochilodus lineatus*)

## **2.2 Local de Coleta e Manutenção da Espécie**

Os peixes do rio Mogi-Guaçu realizam migração reprodutiva rio acima e migração trófica rio abaixo (Godoy, 1975). O ecossistema habitado por estas espécies na bacia do rio Paraná é formado por três rios: Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (Figura 2). O rio Mogi-Guaçu apresenta uma extensão de 473 quilômetros e largura média aproximada de 60 metros. Sua nascente localiza-se a uma altitude de 1.600 metros e sua foz situa-se a 470 metros de altitude, sendo 84% de suas águas situadas no Estado de São Paulo (Capeleti & Petrere, 2006).



**Figura 2.** Rio Mogi-Guaçu na região da Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP.

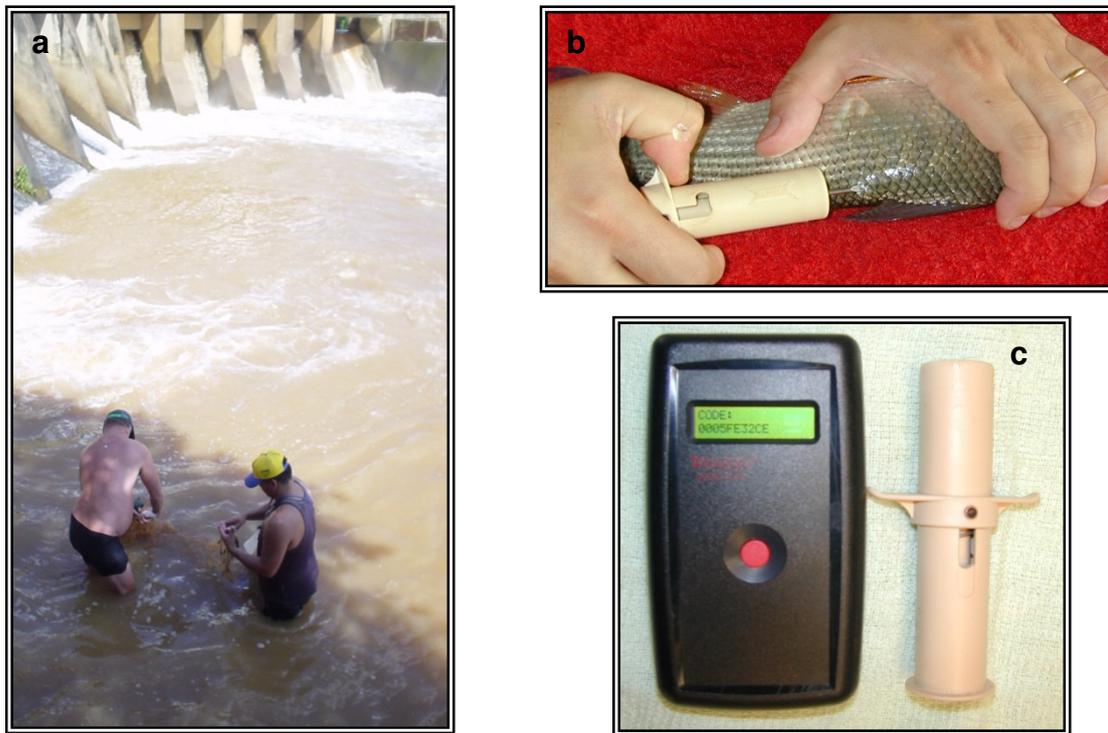
O CEPTA é um Centro Especializado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMbio) (Figura 3). Criado em 1979, seu objetivo é contribuir para o uso sustentável dos recursos ícticos tropicais, através da geração, adaptação e difusão de conhecimentos científicos, tecnológicos e ambientais em benefício da sociedade. Assim, o CEPTA realiza pesquisas de biodiversidade dos recursos ícticos de águas continentais - recursos genéticos; uso sustentável dos recursos pesqueiros (pesca e aqüicultura); melhoria da qualidade ambiental; capacitação de recursos humanos e educação ambiental. O Centro tem como objetivo o estabelecimento de parcerias com instituições nacionais e internacionais, universidades, organizações não governamentais e com a iniciativa privada, buscando sempre a consecução de suas competências.



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

Tendo em vista o interesse em caracterizar citogeneticamente a espécie *Prochilodus lineatus* e identificar a frequência, herança e origem de seus cromossomos supranumerários, assim como buscar um entendimento sobre sua dinâmica evolutiva ao longo dos anos, foram capturados 275 exemplares desta espécie da população natural do rio Mogi-Guaçu, especificamente em Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP (Figura 4a). Após a captura, os animais foram identificados e mantidos em tanques no CEPTA/ICMbio, no município de

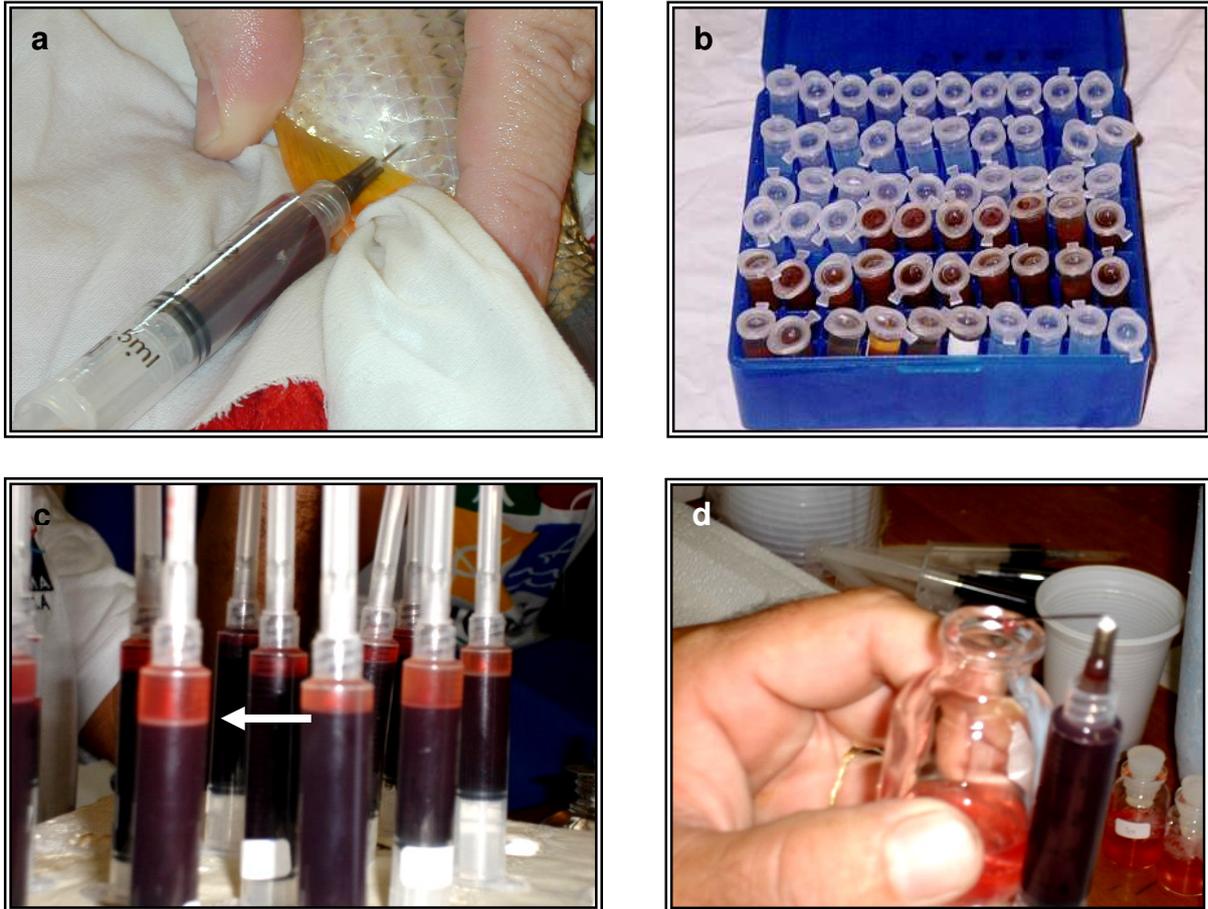
Pirassununga, SP (Figura 3), após serem marcados com *tag* magnéticos (Figuras 4b e 4c).



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

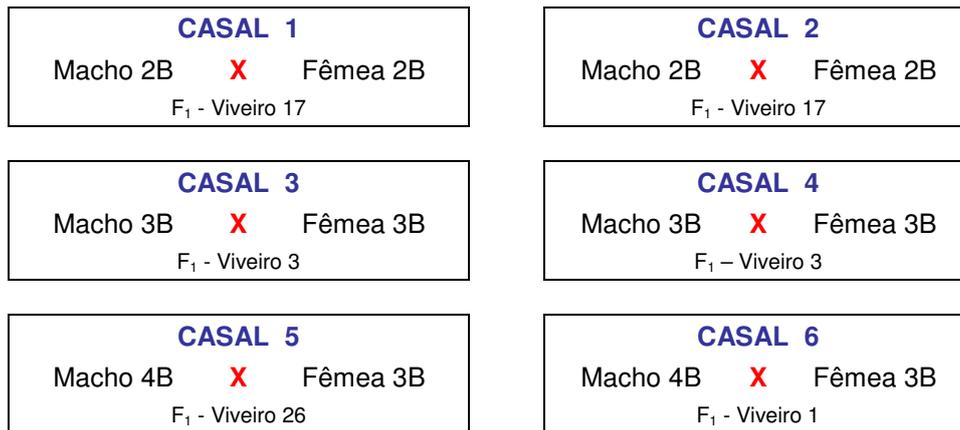
Cerca de 72 exemplares foram selecionadas para formarem os estoques de reprodutores mantidos pelo CEPTA/ICMbio, sendo que todos estes animais foram marcados com *tags* magnéticos (Figuras 4b e 4c) para facilitar sua identificação.

Com a finalidade de otimizar os cruzamentos dirigidos, considerou-se imprescindível o conhecimento prévio do número de cromossomos supranumerários entre estes parentais. Para isto, utilizou-se de uma técnica não invasiva, a cultura de linfócitos, na elaboração das preparações cromossômicas. Desta forma, evitou-se o sacrifício dos animais, além de possibilitar a elaboração dos cruzamentos dirigidos e a reutilização destes peixes em estudos posteriores (Figuras 5 a e 5b).



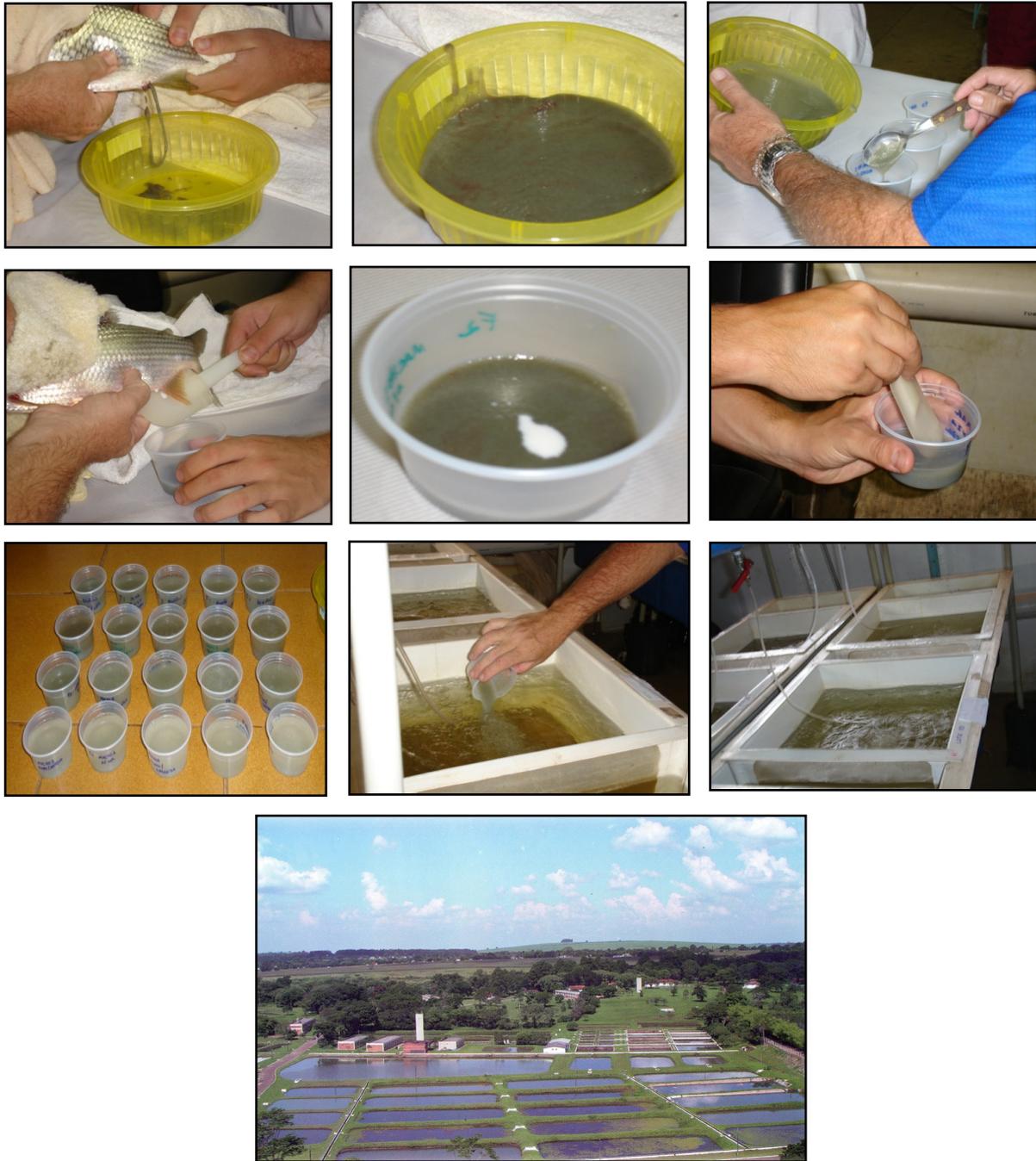
**Figura 5.** Coleta de sangue para análises moleculares (a) e para a confecção de preparações cromossômicas (b). O sangue foi deixado na seringa tempo suficiente para que ocorresse a separação das hemácias e leucócitos (seta branca) (c). Lançamento dos leucócitos em meio de cultura (d)

Após a análise citogenética dos exemplares capturados e identificados, foram registradas as frequências dos cromossomos B e estes passaram a constituir a geração parental. Com base nos valores de frequência determinados, foram selecionados 8 indivíduos, 6 machos e 2 fêmeas, formando 6 casais de reprodutores (Figura 6). Após a elaboração desta matriz de cruzamentos realizou-se a reprodução artificial induzida nas dependências do CEPTA/ICMbio Pirassununga, SP (Figura 7).



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

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



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

Além dos animais estudados citogeneticamente, 50 exemplares de cada viveiro resultantes dos 6 cruzamentos foram marcados com *tags* magnéticos (Figura 4) e mantidos vivos em tanques da piscicultura do CEPTA/ICMbio, Pirassununga. De todos os animais analisados citogeneticamente e identificados com marcadores magnéticos foram coletadas amostras de material biológico (sangue), para realização posterior das análises moleculares (Figura 5b).

Em uma segunda fase deste trabalho buscou-se avaliar a frequência dos cromossomos supranumerários em três diferentes cardumes da população natural de *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP no intuito de averiguar a dinâmica evolutiva atual dos cromossomos B nesta espécie. Para isto, foram realizadas sucessivas capturas durante a estação reprodutiva a qual correspondeu aos meses de dezembro de 2006, janeiro e março de 2007. Após a captura, coletaram-se amostras de sangue de todos os indivíduos para a elaboração de preparações cromossômica a cultura de linfócitos evitando o sacrifício dos animais e possibilitando sua utilização em estudos posteriores.

### **2.3 Métodos**

Na análise citogenética das amostras foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Lozano *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (Foresti *et al.*, 1993) e preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981). Algumas modificações foram realizadas nessas técnicas, ajustando-as para a espécie estudada.

### 2.3.1 Estimulação de Mitoses

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

- 1)** preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2)** incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
- 3)** injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 h;
- 4)** manter o animal em aquário bem aerado por um período de 24 a 48 horas.

### 2.3.2 Preparação Direta para Obtenção de Cromossomos Mitóticos de Peixes

#### *2.3.2.1 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos in vivo*

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

- 1)** injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- 2)** deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3)** sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4)** dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5)** transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6)** retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 7)** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9)** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10)** pingar o material em lâminas;
- 11)** deixar secar ao ar.

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

### 2.3.2.2 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro*

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

- 1) sacrificar o animal, retirando tecidos da parte anterior do rim, brânquias e testículos no caso dos machos;
- 2) colocar os tecidos retirados em placas de Petri contendo 6 ml de solução de Hanks em temperatura ambiente;
- 3) dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, dissociar inicialmente o material com pinças de ponta fina e depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 4) retirar a suspensão celular da placa de Petri e transferi-la para um tubo de centrífuga. Acrescentar 1 gota de solução de colchicina a 0,05% e agitar levemente.
- 5) transferir o tubo para o interior de uma estufa a 37°C por 15 min;
- 6) centrifugar o material a 1.000rpm por 8 min. Retirar e descartar o sobrenadante, acrescentar 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e agitar levemente;
- 7) retornar o tubo para o interior da estufa a 37°C por 30 min;
- 8) retirar o tubo contendo suspensão de células da estufa, adicionar 5 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente) e agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur. Deixar repousar por 5 min em temperatura ambiente;
- 9) adicionar cerca de 6ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos;

- 10)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador novo. Centrifugar por 7 minutos a  $1000 \pm 100$  rpm;
- 11)** repetir o item 8 por duas ou três vezes e fazer a suspensão final;
- 12)** pingar o material em lâminas;
- 13)** deixar secar e proceder à coloração.

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

### *2.3.2.3 Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos por meio de cultura de linfócitos.*

A cultura celular de linfócitos é muito utilizada para obtenção de preparações cromossômicas em várias espécies de peixes. A mais importante característica desta técnica diz respeito ao fato de que o animal não é sacrificado e pode ser utilizado em pesquisas citogenéticas futuras ou em outras pesquisas. A técnica utilizada foi a descrita por Fenocchio & Bertollo (1988), com algumas modificações, e consiste em:

- 1)** anestésiar o animal com solução de benzocaína (100 mg/l);
- 2)** limpar a região caudal com álcool iodado e puncionar a veia caudal, retirando de 3 a 5 ml de sangue;
- 3)** aguardar até separação do soro, linfócitos e hemácias e retirar os linfócitos para serem colocados na cultura. Descartar o soro e as hemácias;
- 4)** colocar os linfócitos em 5,2 ml de meio de cultura, que consiste em: 4 ml de meio 199 (sais de Earle) + 1 ml de soro bovino + 0,1 ml de antibiótico + 0,1 ml de PHA;
- 5)** incubar a cultura a cerca de 28°C por 3 dias;

- 6)** 15 minutos antes de colher a cultura, colocar 0,1 ml de solução aquosa de colchicina a 0,025%;
- 7)** para colher o material, centrifugar por 7 minutos a  $700 \pm 100$  rpm e descartar o sobrenadante;
- 8)** acrescentar 7 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e agitar levemente;
- 9)** deixar o tubo no interior de uma estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos;
- 10)** retirar da estufa, colocar 6 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min a temperatura ambiente;
- 11)** adicionar 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga ( $900 \pm 100$  rpm) por 10 minutos;
- 12)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a  $900 \pm 100$  rpm;
- 13)** repetir o item 12 por duas ou três vezes;
- 14)** pingar o material em lâminas;
- 15)** deixar secar ao ar.

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

### 2.3.3 Utilização de Marcadores Citogenéticos e Citogenético-Moleculares

*2.3.3.1 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) através da Impregnação com Nitrato de Prata ( $\text{Ag-NO}_3$ ).*

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell & Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- **Solução A (solução coloidal reveladora):** 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- **Solução B (solução de nitrato de Prata):** 1 g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4 °C.

O procedimento para a coloração das NORs é o seguinte:

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

#### *2.3.3.2 Caracterização da Heterocromatina Constitutiva*

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

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente e posteriormente lavar com água destilada;

- 2) passar por uma solução de BaOH<sub>2</sub> a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
- 3) banhar em HCl 1N a 60°C e então lavar novamente com água destilada;
- 4) incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH=6,8) a 60°C e lavar com água destilada;
- 5) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH=6,7).

#### 2.3.3.3 Localização Cromossômica por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH).

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada utilizando as sondas DNAr 5S obtida por PCR (Polimerase Chain Reaction) do DNA genômico de *Prochilodus lineatus* usando o primer A(5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e B(5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Pendás *et al.*, 1994). A sonda DNAr 18S foi obtida de *Oreochromis niloticus*, preparada e cedida pelo Dr. Cláudio de Oliveira. A sonda específica de cromossomos supranumerários (PM1B) da espécie *Prochilodus lineatus* foi obtida através da técnica de microdissecção cromossômica (Mühlmann *et al.*, 1995) descrita no item (2.3.3.3.1) e a sonda genômica (PG0B) da espécie *P. lineatus* foi obtida a partir do DNA total desta mesma espécie, não portadora de cromossomo B conforme descrito no item (2.3.3.3.2).

As sondas dos genes ribossomais 5S e 18S foram marcadas com biotina-dATP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick<sup>TM</sup> Labelling System-Gibco.BRL). As sondas específica (PM1B) e a genômica (PG0B) foram marcadas pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), com dUTP - Tetramethyl-rhodamine (Roche Diagnostics) e digoxigenina

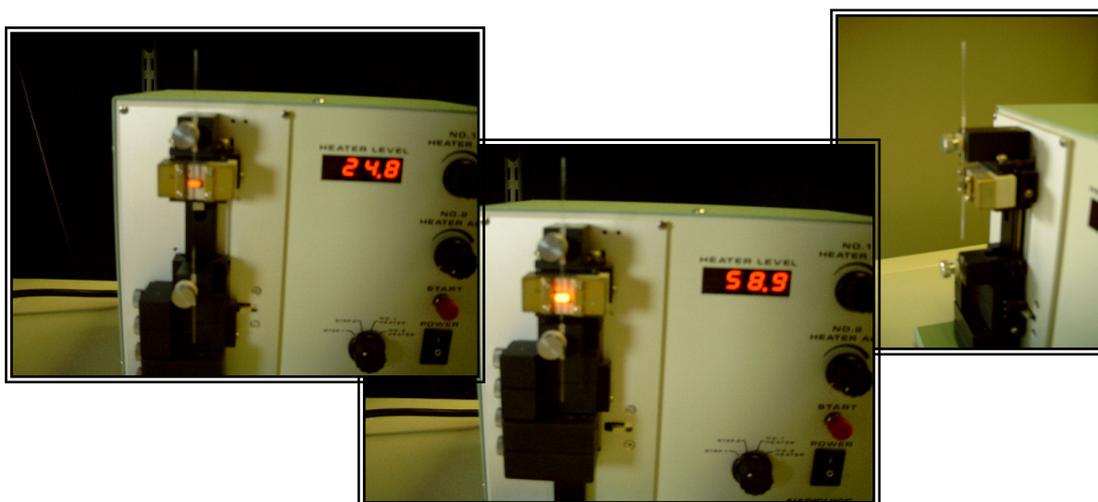
dUTP (Roche Diagnostics), respectivamente. Após a marcação destas quatro sondas, procedeu-se a técnica de hibridação descrita por Porto-Foresti *et al.* (2002).

#### 2.3.3.3.1 Microdissecção cromossômica e amplificação por DOP-PCR

Nas preparações cromossômicas de *Prochilodus lineatus* (realizadas em exemplares capturados no rio Mogi-Guaçu, SP) obtidas segundo a técnica já descrita e após a fixação, armazenadas em metanol a 4°C. No momento da utilização as células foram ressuspendidas em fixador (metanol e ácido acético) gotejadas em uma lamínula limpa e coradas com Giemsa 5%.

##### 2.3.3.3.1.1 Preparação das agulhas

Foram utilizados capilares de borosilicato com aproximadamente 1 milímetro de diâmetro. Os capilares foram colocados em “pulley” (Narishige PC-10) (Figura 8) e aquecidos, formando a ponta da agulha a ser utilizada. Após a preparação estas foram armazenadas em um local protegido para evitar a contaminação.



**Figura 8.** Equipamento utilizado na obtenção de agulhas para a realização da microdissecção cromossômica

#### 2.3.3.3.1.2 *Preparação do material* (Mühlmann *et al.*, 1995)

As preparações cromossômicas devem ser boa qualidade, com pouco contato com ácido acético, sendo preferencialmente mantidas em metanol a -80°C. A suspensão celular deve ser pingada em uma lamínula bem limpa e as metáfases devem ficar bem espalhadas para evitar a microdissecção de fragmentos de outros cromossomos diferentes daquele desejado. Neste caso, a microdissecção foi feita no cromossomo B de exemplar de *Prochilodus lineatus* portador de 1 cromossomo supranumerário, proveniente do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, S.P. Para a realização desta técnica foi utilizado um microscópio invertido (Nikon) e um micromanipulador manual (5171-Eppendorf) com uma agulha de vidro acoplada, previamente esterilizada (Figura 9). Cerca de 5-10 cromossomos B foram microdissectados e transferidos para um tubo Eppendorf.

Foram feitos 3 PCRs (*Polimerase Chain Reaction*). Na primeira PCR, foi feita uma amplificação inespecífica do cromossomo inteiro, através de DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR*), utilizando-se o *primer* DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'), segundo Telenius *et al.* (1992). Seguiu-se uma PCR convencional, para obtenção de um estoque da primeira PCR. Na terceira PCR, também convencional, ocorreu a marcação dos produtos obtidos por microdissecção.

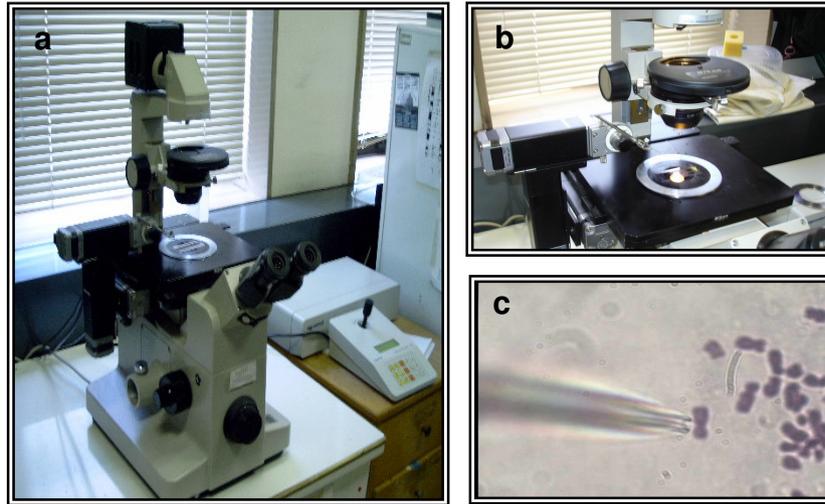
Para a primeira PCR, preparou-se um tubo de 0,5 ml com uma reação de DOP-PCR, que consistiu de 15,5 µl de água destilada esterilizada, 2 µl de tampão da Termosequenase 10X, 4µl de dNTP (2,5 mM cada) e 2 µl *primer* DOP. O tubo com a reação foi aquecido a 90°C por 10 min. Esta solução foi centrifugada brevemente e em seguida, adicionou-se 2,5 µl de 4U µl<sup>-1</sup> Termosequenase (Thermo Sequenase

Cycle Sequencing Kit - USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient, da Eppendorf. Os produtos da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, verificando o tamanho dos fragmentos amplificados, que se apresentaram entre 200 e 600 pb, após cada PCR. Foram seguidas as seguintes condições: 94 °C por 3 min., seguido por 12 ciclos a 94°C por 1,5 min., 37 °C por 2 min. subindo 0,2 °C/s até 72 °C e 72 °C por 1,5 min, em seguida foram realizados 30 ciclos de 94 °C por 1,5 min., 62 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min.

Na segunda PCR, a reação constituiu-se de 33,5 µl de água destilada esterilizada, 5 µl de tampão da Termosequenase 10X, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de DOP *primer* (100 µM) e 0,5 de Taq polymerase. Adicionou-se 2 µl do produto da primeira PCR, tendo como um volume final 50µl.

Na terceira PCR utilizou-se 32,5 µl de água destilada esterilizada, 5 µl de tampão da Termosequenase 10X, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 1µl de dUTP - Tetramethyl-rhodamine (Roche Diagnostics), 3 µl de DOP *primer* (100 µM) e 0,5 µl de 5U/µl Taq polymerase. Adicionou-se 2µl do produto da 2ª PCR, totalizando um volume final de 50µl. A segunda e a terceira PCRs seguiram as seguintes condições: 90 °C por 3 min., seguido por 30 ciclos a 90°C por 1,5 min., 56 °C por 1,5 min. e 72 °C por 1,5 min.

Por fim, foram adicionados 20 µl de solução de hibridação (50% formamida deionizada, 10% de sulfato de dextrano, 2XSSC e 20 mg/ml de albumina fetal bovina) ao DNA específico dos cromossomos supranumerários desta espécie. O DNA marcado foi estocado a -20 °C.



**Figura 9.** Obtenção da sonda específica de cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus* por microdissecção cromossômica. Microdissector Cromossômico (a) evidenciando a agulha de microdissecção cromossômica (b) e o processo de microdissecção cromossômica (c).

#### 2.3.3.3.2 Obtenção da sonda genômica da espécie *Prochilodus lineatus*

Uma alíquota (3 $\mu$ ) de fixação celular mantida em metanol foi colocada em um tubo de microcentrífuga de 0,5 ml. O tubo foi aberto e deixado na estufa a 37 °C permitindo a evaporação do metanol. Após a secagem da preparação cromossômico (*pellet*) esta foi ressuspensa em uma solução de PCR.

A amplificação do DNA foi realizada segundo Telenius *et al.* (1992), os seguintes reagentes foram adicionados no tubo: 10  $\mu$ l de água MiliQ, 2  $\mu$ l de tampão da Termosequenase 10X, 4  $\mu$ l de dNTP (2,5 mM cada), 2  $\mu$ l de *primer* DOP, (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3') (25  $\mu$ M). Esta solução foi aquecida a 90 °C por 10 minutos. Esta solução foi centrifugada brevemente e em seguida, adicionou-se 2,5  $\mu$ l de 4U  $\mu$ l<sup>-1</sup> Termosequenase (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit - USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient, da Eppendorf. Em seguida foi aplicado o seguinte programa: 94 °C por 3 min., seguido por 10 ciclos a 94°C por 1,5 min., 30 °C por 2 min. subindo

0,2 °C/s até 72 °C, em seguida foram realizados 35 ciclos de 94 °C por 1,5 min., 56°C por 1,5 min e 72 °C por 1,5 min.

Os resultados foram observados em gel de agarose 1% e 2µl da alíquota do produto da PCR foram marcadas com digoxigenina dUTP (20 µM dUTP) por PCR utilizando 32,5 µl de água destilada esterilizada, 5 µl de 10X PCR reaction buffer, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 1µl de dUTP marcado, 3 µl de DOP primer (100 µM) e 0,5 µl de 5U/µl Taq polymerase. Totalizando um volume final de 50µl. A reação de PCR seguiu às condições: 90°C por 3 min., seguido por 30 ciclos a 90°C por 1,5 min., 56°C por 1,5 min. e 72°C por 1,5 min.

Por fim, foram adicionados 20 µl de solução de hibridação (50% formamida deionizada, 10% dextran sulfate, 2XSSC e 20 mg/ml de albumina fetal bovina) ao DNA genômico desta espécie. O DNA marcado foi estocado a -20°C.

#### *2.3.3.3 Marcação do DNA pela técnica de nick translation*

Para marcação com biotina-dATP foi seguido o seguinte protocolo:

- 1)** em um tubo de 0,5 ml preparar uma solução contendo 5 µl de uma solução de 10X dNTP (contendo 0,1 mM de biotina-dATP), 5 µl de uma solução tamponada de enzimas (0,0075 unidades/µl de DNase I e 0,5 unidades/µl de DNA polimerase I), 1 µg de DNA e água para um volume final de 45 µl. Misturar a solução em um vórtex e centrifugar brevemente a 14.000 rpm;
- 2)** incubar a 16°C por 1h. O aumento ou a diminuição no tempo de incubação leva a produção de segmentos de DNA mais curtos ou mais longos, respectivamente;

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

#### 2.3.3.3.4 Hibridação

- 1)** Incubar as lâminas em uma solução contendo 200 µl de 2XSSC (pH=7,0) e 2 µl de RNase (100 mg/ml) em uma câmara úmida a 37°C por 1 h;
- 2)** em um *coplin* de vidro preparar 40 ml de uma solução de desnaturação (70% Formamida, 2XSSC) e aquecer a 72°C em um banho-maria. Colocar as lâminas na solução de desnaturação e incubar por 5 min;
- 3)** desidratar as lâminas em banhos sucessivos em etanol a 70%, 80% e 100% a -20°C por 3 min cada. Deixar as lâminas secando ao ar;
- 4)** diluir as sondas em solução de hibridação na proporção de 7,5 µl de sonda para 7,5 µl de solução de hibridação. No caso de *double FISH* utilizar 7,5 µl de sonda

específica marcada pelo método direto e 7,5 µl de sonda genômica marcada pelo método indireto;

**5)** desnaturar as sondas incubando-as em um banho-maria a 72°C por 10 min;

**6)** colocar 15 µl das sondas diluídas em cada lâmina e cobrir com lamínula. Selar as bordas da lamínula com cimento de borracha;

**7)** incubar as lâminas a 37°C por cerca de 15 h (*over night*) em uma câmara úmida;

**8)** remover o cimento de borracha e as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de 50% formamida/2XSSC por 10 min cada. Nesse passo a estringência da reação pode ser aumentada ou diminuída na mesma proporção em que a concentração de formamida é aumentada ou diminuída;

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

**10)** remover as lâminas da solução de 4XSSC. Aplicar em cada gota de suspensão celular 60 µl do reagente de detecção (avidina marcada com Fluoresceína para as sondas dos genes ribossomais 5S e 18S, anti-digoxigenina marcada com Fluoresceína para a sonda genômica da espécie *Prochilodus lineatus*; para a sonda específica de cromossomos supranumerário não se realizou a detecção pois, esta foi marcada diretamente com dUTP - Tetramethyl-rhodamine) e cobrir com uma lamínula de plástico. Incubar as lâminas a 37°C por 15 a 60 min em uma câmara úmida.

**11)** remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de PBD (PBS com 1% de Triton X-100) por 5 min a temperatura ambiente;

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

**13)** neste passo é possível ampliar o sinal das sondas aplicando uma solução de anticorpo (anti-avidina para as sondas 5S e 18S e anti-digoxigenina-ratón para a sonda genômica). Esta amplificação somente é necessária para seqüências representadas por um reduzido número de cópias. Para as seqüências com um grande número de cópias procedeu-se diretamente com a contra-coloração e análise em microscópio de fluorescência (item 19) remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de PBD por 5 min a temperatura ambiente;

**14)** para ampliar o sinal das sondas deve-se remover as lâminas da solução de PBS e aplicar 60 µl de anti-avidina ou anti-digoxigenin-ratón a para cada gota de suspensão celular. Cobrir com uma lamínula de plástico e incubar as lâminas a 37°C por 1h em uma câmara úmida.

**15)** remover as lamínulas. Lavar as lâminas em uma solução de PBS por 5 min a temperatura ambiente;

**16)** remover as lâminas da solução de PBS e aplicar em cada gota de suspensão celular 60 µl do reagente de detecção (avidina marcada com Fluoresceína ou anti-digoxigenina com Fluoresceína ) e cobrir com uma lamínula de plástico. Incubar as lâminas a 37°C por 15 a 60 min em uma câmara úmida;

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

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

**19)** contra-corar com 15 µl de uma solução de iodeto de propídio/antifade para sondas marcadas com biotina e DAPI para sondas marcadas com digoxigenina;

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

### 2.3.4 Estudos Cariotípicos

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

Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos, foram fotografadas em fotomicroscópio OLYMPUS, modelo BX50, com objetiva de imersão de 100X. O filme utilizado foi o AGFA HDP e as cópias dos negativos foram feitas em papel fotográfico Kodabromide F3.

#### *2.3.4.1 Montagem dos Cariótipos*

Os cromossomos recortados e dispostos em cartolina com fita adesiva foram inicialmente arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho, para a organização final do cariótipo, conforme descrito por Levan *et al.* (1964).

### 2.3.5 Marcação dos Exemplares

Tendo em vista a realização de um trabalho de caracterização genética dos indivíduos utilizados como reprodutores, exemplares das espécies foram marcados com *tags* e mantidos vivos em tanques da piscicultura do CEPTA/ICMbio. Os *tags*

são pequenos bastonetes de metal magnetizados, que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras, correntemente empregado para identificação de diversos produtos.

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

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

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

## **CAPÍTULO 1**

### **CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DA ESPÉCIE**

***Prochilodus lineatus* DO RIO MOGI-GUAÇU,**

**PIRASSUNUNGA, SP**

## RESUMO

A família Prochilodontidae é caracterizada por apresentar uma constituição cariotípica conservada. Dentro do gênero *Prochilodus* a espécie *Prochilodus lineatus* é certamente a mais estudada sob o ponto de vista citogenético. Neste estudo realizou-se a caracterização citogenética de exemplares de *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu entre os anos de 2003 a 2007 através da utilização de marcadores citogenéticos como Giemsa, NOR e Banda C e marcadores citogenético-moleculares (FISH) na detecção dos genes ribossomais 5S e 18S. Todos os animais analisados apresentaram  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta/submetacêntricos, além da presença de até 7 microcromossomos supranumerários. A NOR foi evidenciada em apenas um par cromossômico mostrando-se polimórfica em tamanho. O padrão de heterocromatina constitutiva esteve presente na região centromérica de todos os cromossomos do complemento padrão A; entretanto, os microcromossomos mostraram-se totalmente heterocromáticos pela técnica de Banda C. A distribuição dos genes ribossomais 5S e 18S apresentou sintenia no par cromossômico portador da NOR, não tendo sido observados *clusters* destes genes em outros cromossomos do conjunto cariotípico. Apesar das características cariotípicas serem consideradas conservadas entre os *Prochilodus*, pequenas diferenças na distribuição dos genes ribossomais detectadas nesta espécie com relação a exemplares de *P. lineatus* de outras localidades já descritas, podem estar associadas a diferenças evolutivas que estas seqüências repetitivas vêm sofrendo ao longo dos anos.

## INTRODUÇÃO

Os Peixes da família Prochilodontidae constituem espécies importantes para a pesca comercial e de subsistência em ambientes neotropicais da América do Sul, com exceção do Chile onde estas espécies não são encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983). Segundo Castro & Vari (2004) esta família compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies).

O gênero *Prochilodus* é composto por espécies amplamente distribuídas em águas sul americanas sendo considerados peixes de relevante importância para o comércio e à pesca de subsistência (Mago-Leccia, 1972). Dentre todas as espécies deste gênero, *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimatá, é certamente a mais abundante e a mais estudada (Godoy, 1975).

Informações cromossômicas sobre representantes do gênero *Prochilodus* têm mostrado uma estrutura cariotípica conservada com  $2n=54$  cromossomos (Pauls & Bertollo, 1983, 1990). Entretanto, poucas espécies e/ou populações apresentam variações cariotípicas relacionada à presença de cromossomos supranumerários como em *P. lineatus* (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.* 1997; Dias *et al.*, 1998; Maistro *et al.*, 2000; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho, 2003; Artoni *et al.*, 2006). De conformidade com a maioria dos cariótipos dos peixes neotropicais, a espécie *P. lineatus* contém somente um par de cromossomo com Região Organizadora de Nucléolo (NOR) (Pauls & Bertollo, 1990).

A localização *in situ* dos genes ribossomais DNAr 5S e 18S indicam sintonia na espécie *P. lineatus* e *Prochilodus Argenteus*, assim como polimorfismo no número de genes 18S localizados nas Regiões Organizadoras de Nucléolo (Jesus & Moreira-Filho, 2003; Hatanaka & Galetti Jr. 2004).

Vários estudos de bandamento C têm sido realizados em representantes da família Prochilodontidae, inclusive na espécie *Prochilodus lineatus*. Um padrão de heterocromatina constitutiva freqüentemente observado está presente na região centromérica de todos os cromossomos do complemento padrão (A) na forma de blocos bem caracterizados (Pauls & Bertollo, 1990; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho 2003; Artoni *et al.*, 2006). Os cromossomos supranumerários geralmente se apresentam inteiramente heterocromáticos nesta espécie (Pauls & Bertollo, 1990; Maistro *et al.*, 2000; Cavallaro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho; Artoni *et al.*, 2006).

Apesar das características cromossômicas de *P. lineatus* serem consideradas conservadas, o objetivo deste estudo foi caracterizar citogeneticamente exemplares desta espécie provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP buscando similaridades e possíveis diferenças citogenéticas que possam ter ocorrido nesta população ao longo dos anos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 275 espécies de *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, coletados entre os anos de 2003 a 2007. Estes exemplares foram mantidos nos tanques do CEPTA/ICMbio, Pirassununga, SP para a realização de estudos posteriores.

Cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de cultura de linfócito descrita por Fenocchio & Bertollo *et al.* (1988), com algumas modificações. A montagem do cariótipo da espécie foi realizada de acordo com Levan *et al.* (1964).

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) foram identificadas no complemento cromossômico utilizando a técnica de coloração por nitrato de Prata

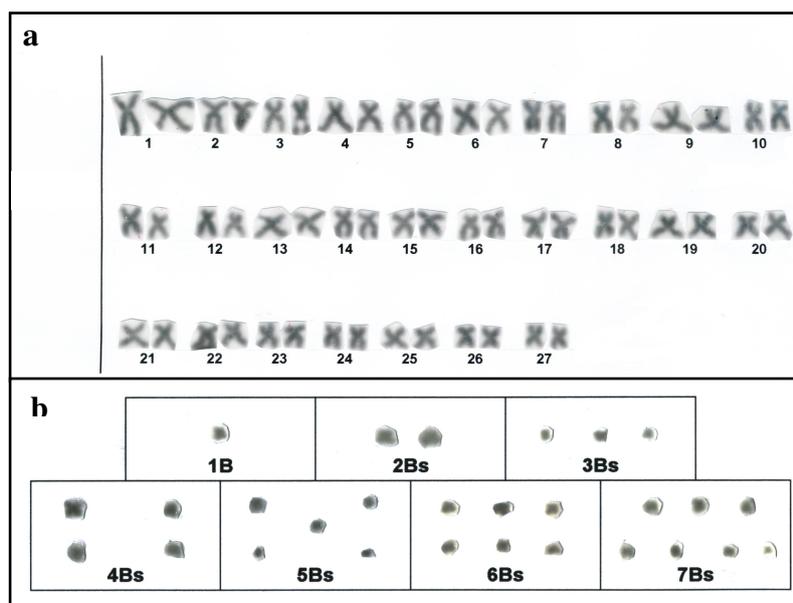
desenvolvida por Howell & Black (1980) e os padrões de heterocromatina constitutiva nas preparações cromossômicas foram obtidos segundo o método proposto por Summer (1972).

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com Porto-Foresti *et al.* (2002) utilizando sondas de DNAr 5S obtidas por PCR (Polimerase Chain Reaction) do DNA genômico de *Prochilodus lineatus* usando o *primer* A(5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e B(5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Pendás, *et al.*, 1994) e a sonda para DNAr 18S foi obtida de *Oreochromis niloticus*, preparada e cedida pelo Dr. Cláudio de Oliveira. As sondas foram marcadas com o Bionick Labeling System-Gibco. BRL de acordo com as instruções do fabricante.

A hibridação *in situ* foi realizada utilizando avidina-Fluoresceína. As Sondas 5S e 18S foram desnaturadas em formamida 70%: 2xSSC por cinco minutos. O DNA foi hibridado a 37°C *overnight* em uma câmara úmida (1µg de sonda desnaturada, formamida 50%; 10mg ml de sulfato de dextrano; 2xSSC, 5 mg ml de DNA de esperma de salmão). As sondas hibridadas foram detectadas pela anti-avidina. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com Iodeto de Propídio e fotografadas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX50 equipado com Epi-Fluorescência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exemplares da espécie *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, coletados entre os anos de 2003 a 2007 apresentaram uma constituição cariotípica composta de  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta/submetacêntricos, além da presença de até 7 cromossomos supranumerários, sendo 2 cromossomos B o número modal para esta espécie (Figura 1). A organização cromossômica referente à espécie estudada já tem sido descrita em vários estudos citogenéticos realizados por Pauls & Bertollo (1983, 1990); Oliveira *et al.* (1997); Cavallaro *et al.* (2000); Jesus & Moreira-Filho, (2003) e Artoni *et al.* (2006).



**Figura 1.** Cariótipo da espécie *Prochilodus lineatus* com  $2n=54$  cromossomos dos tipos meta/submetacêntrico (a); variação de até 7 microcromossomos supranumerários encontrada nos exemplares desta espécie (b).

Com a utilização de técnica de detecção das Regiões Organizadora de Nucléolo pela impregnação por nitrato de Prata observou-se marcação no braço longo do segundo maior par de cromossomos metacêntricos do conjunto cariotípico da espécie *Prochilodus lineatus* (Figura 2). Confirmando dados publicados por Pauls

& Bertollo, (1990) e Jesus & Moreira-Filho (2003) em estudos realizados também em exemplares de curimatás provenientes do rio Mogi-Guaçu. Além disso, constatou-se a presença de polimorfismo quanto ao tamanho desta região encontrada nos cromossomos homólogos.

A técnica de detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) tem sido extensivamente estudada em peixes e é considerada um bom marcador genético, auxiliando em estudos citotaxonômicos das espécies (Galetti Jr, 1998). Esta região cromossômica tem mostrado alta variabilidade nos diferentes grupos em termos de número, localização e tamanho de cístrons ribossomais (Jesus & Moreira-Filho, 2003). Como na maioria dos peixes neotropicais cariotipados, *P. lineatus* apresenta somente um par de cromossomo portador de Região Organizadora de Nucléolo (NOR) (Pauls & Bertollo, 1990; Maistro *et al.*, 2000; Jesus & Moreira-Filho, 2003; Vicari *et al.*, 2006; Artoni *et al.*, 2006).

Maistro *et al.* (2000) ao estudarem a Região Organizadora de Nucléolo (NOR) em *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, encontraram uma marcação no braço longo do terceiro par de cromossomo, além de um grande polimorfismo freqüentemente encontrado neste segmento cromossômico. Já Vicari *et al.* (2006) ao estudarem exemplares da espécie *P. lineatus* provenientes da lagoa Dourada bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa, PR, identificaram a NOR logo abaixo do centrômero na região intersticial do braço longo do quarto par de cromossomos, além da presença de polimorfismo de tamanho encontrado nestes cromossomos homólogos. Polimorfismos de tamanhos da NOR são relativamente comuns em peixes neotropicais (Foresti *et al.*, 1981; Brum *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Metáfases somáticas da espécie *Prochilodus lineatus* evidenciando o par portador da NOR (setas) obtida de exemplares da população do rio Mogi-Guaçu

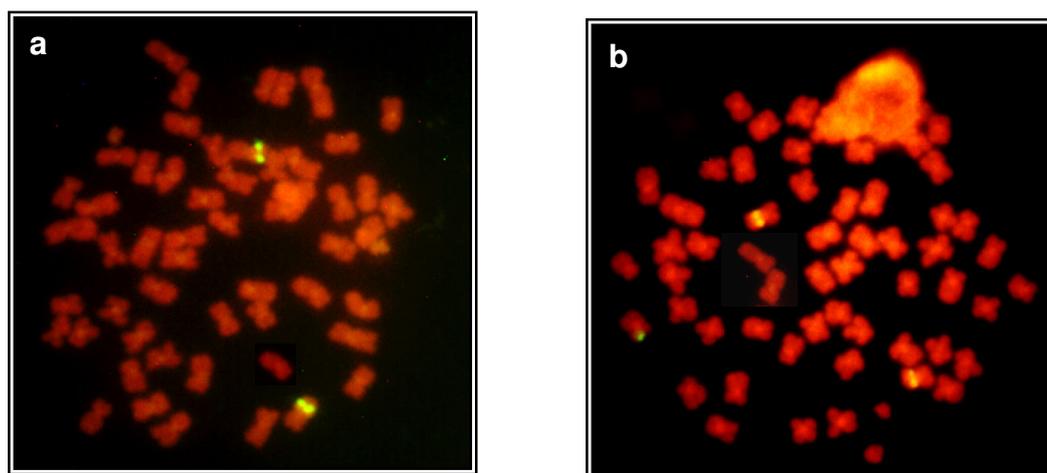
Em alguns exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, SP, Jesus & Moreira-Filho (2003), detectaram NOR não somente em um par de cromossomos metacêntricos, mas também foi observado um número variável de sítios ribossomais (um ou dois pequenos sítios adicionais inativos), sugerindo polimorfismo numérico interindividual nas regiões de DNAr 18S.

Uma limitação apresentada pelo uso desta técnica de NOR refere-se ao fato de que a Prata não se liga às regiões de DNAr, mas sim às proteínas associadas à estrutura nucleolar, limitando-se a identificar somente as NORs que estiverem ativas na intérfase procedente (Miller *et al.*, 1976). Assim, localização das NORs por meio da hibridização isotópica ou não isotópica com sondas de RNAr ou DNAr em fixações cromossômicas tem sido uma técnica bastante eficiente na investigação do posicionamento dos genes ribossomais (Long & Dawid, 1980).

Para uma melhor caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo em *P. lineatus* foi realizada a técnica de hibridação *in situ* com a utilização dos genes ribossomais DNAr 5S e 18S. Estes foram observados em uma condição de sintonia, ou seja, o gene ribossomal 5S localizou-se subterminalmente no braço longo do segundo par de um cromossomo metacêntrico adjacente à localização do gene 18S

(Figura 3), em concordância com os dados observados anteriormente por Jesus & Moreira-Filho (2003), Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e Vicari *et al.* (2006). Nenhum *cluster* adicional foi encontrado nos cromossomos desta espécie com relação ao gene 18S como observado por Maistro *et al.* (2000) e Vicari *et al.* (2000) e ao gene 5S descrito por Jesus & Moreira-Filho (2003) e por Vicari *et al.* (2006) ao estudarem exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu e da lagoa da Dourada, respectivamente.

A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação rara entre os vertebrados. Além da descrição na espécie *P. lineatus*, esta sintenia também foi observada em *Salmo solar* (Pendás *et al.*, 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Móran *et al.*, 1996), *Astyanax* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002) e em anfíbios (Lucchini *et al.*, 1993). Por outro lado, em várias espécies de peixes, este *loci* tem sido mapeado em distintos cromossomos (Martínez *et al.*, 1996; Morán *et al.*, 1996; Martins & Galetti, 2001; Born & Bertollo, 2000; Ferro *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2001; Wasko *et al.*, 2001), representando a condição mais freqüente descrita para vertebrados (Lucchini *et al.*, 1993; Drouin & Muniz de Sá, 1995; Suzuki *et al.*, 1996).



**Figura 3.** Metáfase de *Prochilodus lineatus* evidenciando a localização do gene ribossomal 5S em (a) e 18S em (b).

O mapeamento da localização do DNAr 5S em peixe tem demonstrado uma alta frequência para um único *loci* cromossômico, que poderia corresponder à condição ancestral deste grupo (Martins & Galetti Jr., 1999).

Hatanaka & Galetti Jr., (2004) detectaram o gene DNAr 5S no braço longo do cromossomo portador da NOR na espécie *Prochilodus argenteus*. Estes autores confirmaram esta posição depois de análise seqüencial por meio da coloração por nitrato de Prata, revelando que o gene 5S DNAr ocupa uma posição adjacente mais terminal no cromossomo em relação ao gene ribossomal DNAr 18S. Além disso, estes autores observaram também pequenos sinais fluorescentes ocasionalmente identificados no terceiro par cromossômico indicando a presença de outros *clusters* 5S.

Jesus & Moreira-Filho, (2003) realizaram a hibridação *in situ* fluorescente em exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu com a sonda DNAr 18S mostrando sinais fluorescentes localizados na região intersticial do braço longo do segundo par cromossômico, correspondendo ao cromossomo portador da NOR. *Locus* adicionais inativos do DNAr 18S também foram encontrados em alguns indivíduos desta espécie. Polimorfismos numéricos da região ribossomal também foram recentemente descritos em *P. argenteus* da bacia do rio São Francisco por Hatanaka & Galetti Jr. (2004). Análises por hibridação *in situ* mostraram a presença de três *locus* de DNAr 18S em adição aos dois comumente detectados pelo nitrato de Prata. Estes *clusters* adicionais nesta espécie foram localizados somente nas regiões teloméricas dos cromossomos.

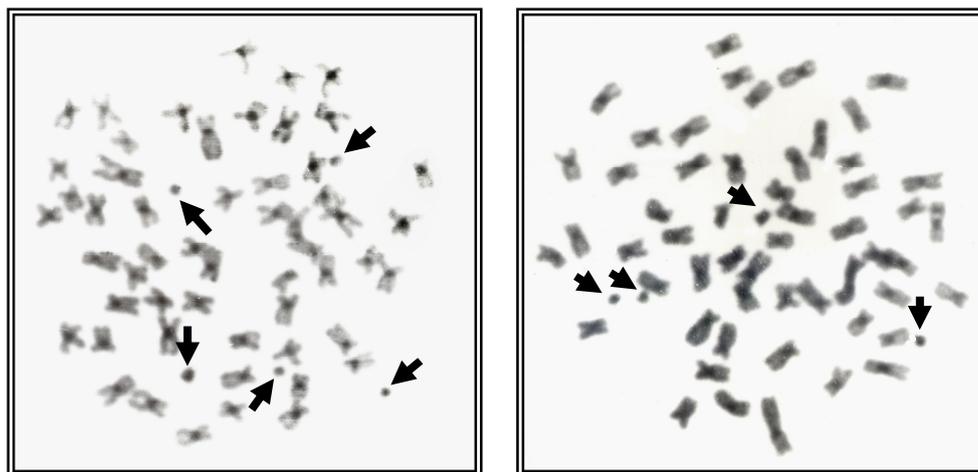
Entretanto em *P. lineatus* estes *clusters* foram localizados na região pericentromérica dos cromossomos (Jesus & Moreira-Filho, 2003) evidenciando, desta forma, diferenças no padrão de distribuição do DNAr 45S no cariótipo destas

duas espécies. Ao lado de rearranjos cromossômicos, mecanismo de transposição também tem sido considerado eventos responsáveis pela dispersão da NOR no genoma dos diferentes grupos (Castro *et al.*, 1996; Almeida-Toledo *et al.*, 1996).

Genes ribossomais 5S ou 18S não foram localizados até o presente nos microcromossomos B de *P. lineatus*. (Jesus & Moreira-Filho, 2003). Incluindo os dados obtidos na análise dos exemplares desta mesma espécie realizada no presente trabalho. A ausência de genes ribossomais nos cromossomos supranumerários corresponde à condição mais comum e encontrada nos vários organismos portadores de B.

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

Vários estudos de bandamento C têm sido realizados na família Prochilodontidae, incluindo principalmente os representantes da espécie *Prochilodus lineatus*. Neste trabalho foram observados blocos heterocromáticos conspicuos nas regiões centroméricas dos cromossomos do complemento padrão e todos os cromossomos supranumerários mostraram-se heterocromáticos (Figura 4). Estes dados estão de acordo com as descrições feitas para esta espécie por Jesus & Moreira-Filho, (2003) e Artoni *et al.* (2006).



**Figura 5.** Metáfase de *Prochilodus lineatus* evidenciando a presença de blocos conspícuos de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas dos cromossomos do conjunto cromossômica A. Todos os cromossomos B mostraram-se heterocromáticos (setas).

Maistro *et al.* (2000) descreveram um padrão de heterocromatina constitutiva para regiões centroméricas dos cromossomos do complemento A de curimatás capturados no rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo, onde foi observada claramente a presença de heterocromatina constitutiva também nas regiões teloméricas. Entretanto, estas marcações não foram observadas nas preparações analisadas no presente trabalho. Os autores confirmaram o caráter heterocromático dos cromossomos supranumerários.

Artoni *et al.* (2006) ao caracterizarem a espécie *Prochilodus lineatus* da lagoa Dourada na bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa, PR, observaram padrões de heterocromatina na região centromérica, assim como na região telomérica de alguns pares de cromossomos do complemento A. Os cromossomos B desta espécie analisada também se mostraram freqüentemente heterocromáticos. Entretanto, os autores descrevem que, nas preparações analisadas um pequeno segmento da Banda C negativo ocorreu na região pericentromérica de um cromossomo B metacêntrico (Artoni *et al.*, 2006).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho podemos constatar que embora a constituição cariotípica da espécie *P. lineatus* seja bem conservada, observaram-se pequenas diferenças quanto à localização e distribuição dos genes ribossomais e dos blocos de heterocromatina nos cromossomos desta espécie, quando comparados a exemplares de diferentes localidades já descritas. Tais diferenças podem estar associadas a modificações evolutivas que estas seqüências repetitivas vêm sofrendo nestas populações.

## **CAPÍTULO 2**

**ANÁLISE DA HERANÇA DOS CROMOSSOMOS  
SUPRANUMERÁRIOS DO CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*)  
RESULTANTES DE CRUZAMENTOS DIRIGIDOS EM MATRIZES NO  
CEPTA/ICMbio, PIRASSUNUNGA, SP**

## RESUMO

*Prochilodus lineatus* é uma espécie bastante utilizada em projetos de piscicultura principalmente no sul do Brasil. Sob o ponto de vista citogenético, apresenta um cariótipo básico composto por  $2n=54$  cromossomos, além da presença de até 7 cromossomos B ou supranumerários. Estes cromossomos extras são de pequeno tamanho, freqüentemente heterocromáticos e geralmente não apresentam homologia com o complemento padrão A, podendo variar tanto no número quanto na morfologia. Intensos estudos têm sido realizados no intuito de buscar informações sobre sua função, origem e herança nos organismos portadores. Diante disso, este trabalho objetivou o estudo da herança dos cromossomos B resultantes de cruzamentos dirigidos na espécie *P. lineatus* proveniente do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. Estes cruzamentos foram realizados no CEPTA/ICMbio, Pirassununga, SP. Os dados obtidos sobre padrão de transmissão destes microcromossomos mostraram-se consistentes ( $K_B= 0,48$ ), com a expectativa do comportamento meiótico regular seguindo um modelo de transmissão mendeliano ( $K_B= 0,5$ ). Observou-se, portanto, um processo de não acumulação destes cromossomos B manifestado nas gerações filiais desta referida espécie. Estes resultados parecem indicar que os cromossomos supranumerários presentes na espécie *P. lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu estão em uma fase de neutralização, seguindo um padrão de herança mendeliana.

## INTRODUÇÃO

Cromossomos B, supranumerários ou acessórios são elementos genômicos extras, dispensáveis, presentes em alguns indivíduos de algumas populações em muitas espécies de plantas, animais (Jones & Rees 1982; Jones & Puertas 1993; Jones 1995) e em várias espécies de fungos (Mills & McCluskey 1990; Miao *et al.*, 1991 a,b; Tzeng *et al.*, 1992; Gêiser *et al.*, 1996; Leclair *et al.*, 1996). A principal característica destes é não recombinar com os cromossomos do complemento padrão, seguindo seu próprio caminho evolutivo (Camacho *et al.*, 2000). Embora possa ser constatado um aumento no conhecimento destes elementos estruturais do cariótipo das espécies, ainda pouco é sabido sobre sua estrutura, função e comportamento, o que torna difícil uma conclusão geral sobre sua importância para a espécie (Oliveira *et al.*, 1997). Portanto, é essencial o conhecimento sobre os efeitos dos cromossomos B e seus mecanismos de herança no intuito de se entender a importância de sua presença no genoma dos indivíduos portadores (Camacho *et al.*, 1997).

Vários estudos têm sido realizados concernentes à herança dos cromossomos B. Entretanto, quase todos os resultados demonstraram que estes elementos usualmente exibem um mecanismo de acumulação que explicaria sua natureza parasítica (Jones, 1991). De acordo com Carlson & Roseman (1992) estes mecanismos de acumulação são suficientes para a manutenção do cromossomo B em populações de milho; todavia, não pode ser considerado na diferenciação das freqüências dos B entre outras diversas populações (Chiavarino *et al.*, 1995; Naranjo *et al.*, 1995). A variação no padrão de transmissão dos cromossomos B é um aspecto comum de herança, na qual a forma que estes são perdidos em algumas

progênies e aumentada em número em outras é sempre comparada à expectativa Mendeliana (Chiavarino *et al.*, 1998).

O controle genético do padrão desta transmissão tem sido demonstrado em algumas espécies de animais como no gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw & Hewitt, 1985; Shaw *et al.*, 1985); no bicho da farinha *Pseudococcus affinis*, (Nur & Brett, 1987, 1988); no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Herrera *et al.*, 1996) e em algumas plantas como, *Hypochoeris maculata* (Parker *et al.*, 1982); *Aegilops speltoides* (Cebriá *et al.*, 1994) e em *Allium schoenoprasum* (Bougourd & Plowman, 1996).

De acordo com a presença de mecanismos de acumulação e seus possíveis efeitos, dois modelos de equilíbrio podem ser mencionados. O modelo heterótico aponta para um balanço entre os efeitos positivos dos cromossomos B nas formas hospedeiras, quando eles ocorrem em baixo número e efeitos negativos quando eles ocorrem em alto número. Entretanto, este modelo não contempla um mecanismo de acumulação (White, 1973). O modelo parasítico proposto por Östergren (1945) e Nur (1966a,b, 1977), ou modelo egoísta definido por Jones (1985) e Shaw & Hewitt (1990), assume que os cromossomos B são mantidos na população por meio de mecanismos de acumulação, os quais contrabalanceiam seus efeitos deletérios no genoma hospedeiro.

Recentemente, um modelo de não equilíbrio da evolução dos cromossomos B a longo prazo foi proposto por Zurita *et al.* (1998). De acordo com este modelo, um cromossomo B parasítico que tendo perdido seu mecanismo de acumulação, estaria destinado a desaparecer, quer de modo rápido, lento ou muito lentamente da população, em um longo processo de extinção ao acaso, alcançando então um

estágio de neutralização. Diante disso, uma nova variação de cromossomo B poderia aparecer e reiniciar o ciclo (Herrera *et al.*, 1996).

A expectativa do padrão de transmissão mendeliana dos cromossomos B é considerada 0,5, ou seja, de acordo com a lei de segregação proposta por Mendel a transmissão de uma determinada característica envolveria a metade das informações genéticas contidas em cada progenitor. Contudo, esta condição é tipicamente baixa devido ao fato destes serem mitoticamente e/ou meioticamente instável (Camacho *et al.*, 2000). Muitos cromossomos B registraram um padrão de transmissão claramente maior que 0,5, exibindo, desta forma, o mecanismo de acumulação que é a mais importante propriedade dos cromossomos B parasíticos. A acumulação pode ocorrer antes, durante e após a meiose (Jones, 1991). Segundo Camacho *et al.* (2000), busca-se exaustivamente o principal mecanismo citológico causador desta acumulação.

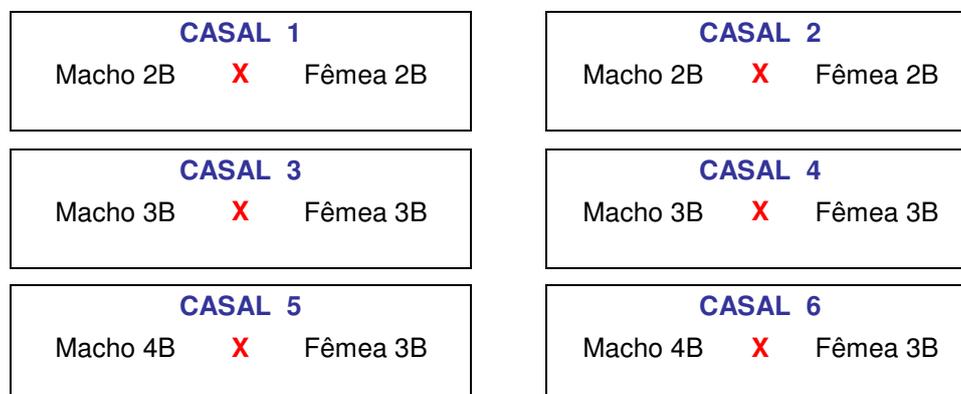
A primeira ocorrência de cromossomos B entre os peixes neotropicais foi registrada por Pauls & Bertollo (1983) em *Prochilodus lineatus*. Entretanto, estudos concernentes à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes portadores são ainda bastante escassos (Oliveira *et al.*, 1997). Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração da herança paternal em peixes ginogenético na espécie *Poecilia formosa* (Schartl *et al.*, 1995). Posteriormente, Oliveira *et al.* (1997) realizaram uma análise inicial do padrão de herança dos cromossomos B em *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu por meio de cruzamentos dirigidos. O padrão de transmissão observado foi de  $K_B = 0,511$ , que consistente com a expectativa mendeliana ( $K_B = 0,5$ ).

Com base nestas análises preliminares do padrão de herança dos cromossomos supranumerários em peixes e de modo especial na espécie *P.*

*lineatus*, o presente estudo visou uma análise aprofundada do padrão de transmissão dos elementos B em *Prochilodus lineatus* por meio de cruzamentos dirigidos, estabelecendo relações de manutenção destes microcromossomos entre os elementos componentes de populações naturais e na piscicultura.

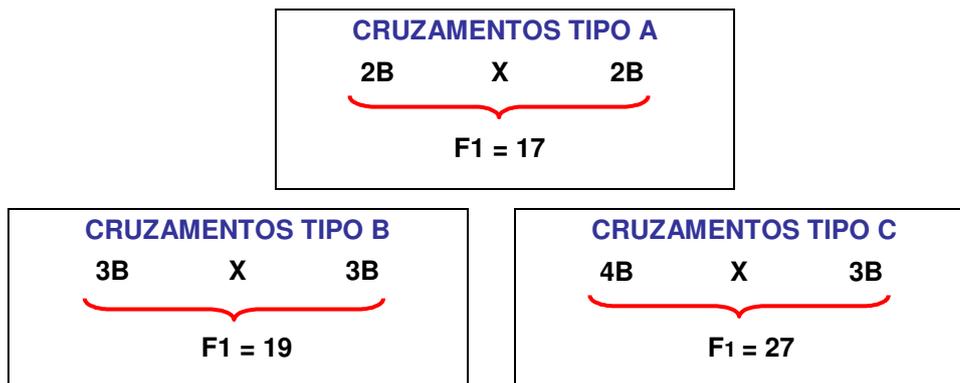
## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados citogeneticamente dois grupos de *P. lineatus*. O primeiro era composto por seis casais formados pela combinação de gametas envolvendo seis machos e duas fêmeas. A primeira fêmea portadora de 2B foi cruzada com um macho portador 2B e com outro macho com 3B em seu conjunto caritotípico. A segunda fêmea portadora de 3B foi cruzada com 2 machos portadores de 3B cada e com outros 2 machos com 4B em seus conjuntos cariotípicos (Tabela 1). Os indivíduos utilizados como geração parental foram capturados na população natural do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo, Brasil. A reprodução induzida foi realizada no Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, CEPTA/ICMbio, município de Pirassununga, SP.



**Figura 1.** Cruzamentos envolvendo as 2 fêmeas e os 6 machos distribuídos de acordo com a presença de seus respectivos cromossomos supranumerários, formando os seis casais.

O segundo grupo era composto por 63 indivíduos obtidos a partir dos cruzamentos dirigidos representando a geração filial. Para fim de análise, os indivíduos da geração filial resultante de cruzamentos onde os parentais apresentavam número de cromossomos B iguais foram agrupados, resultando em, 3 possibilidades de 3 cruzamentos dirigidos (Figura 2)



**Figura 2.** Formação dos três tipos de casais de *Prochilodus lineatus* através do agrupamento dos parentais com número igual de cromossomos B e suas respectivas gerações filiais (F1).

As preparações cromossômicas dos parentais foram obtidas por cultura de linfócitos usando o método utilizado por Fenocchio & Bertollo (1988), com algumas modificações. As preparações cromossômicas da geração filial foram obtidas utilizando-se fragmentos de tecido do rim anterior pelo método utilizado por Foresti *et al.* (1981). Todos os parentais foram marcados com *tag* magnéticos segundo Porto-Foresti (2001) e mantidos em tanques no CEPTA/ICMbio para estudos posteriores.

A morfologia cromossômica foi determinada de conformidade com o proposto por Levan *et al.* (1964), com os cromossomos sendo classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a).

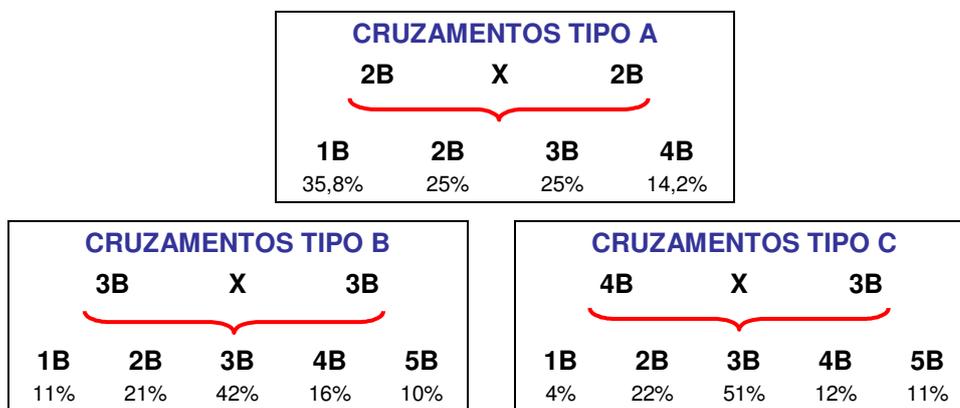
Para o estabelecimento do número modal de B, foram analisadas 30 células com  $2n=54$  cromossomos em cada indivíduo. O padrão de transmissão dos

cromossomos B (KB) foi investigado usando o teste Z segundo López-Léon *et al.*, (1992).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Foram analisados citogeneticamente 8 exemplares da geração parental e 63 indivíduos da geração filial obtidos através dos cruzamentos dirigidos de exemplares desta espécie provenientes da população natural do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. Para fins de análise da amostragem da geração filial, os cruzamentos onde os parentais apresentavam o mesmo número de cromossomos B foram agrupados, formando 3 possibilidades de cruzamentos controlados (Figura 3). No primeiro tipo de cruzamento, onde ambos os parentais apresentaram 2 cromossomos B, a proporção de cromossomos B manifestada na geração filial foi de 35,8% dos indivíduos portando 1 cromossomo B, 25% dos indivíduos apresentando 2, 25% dos indivíduos apresentando 3 cromossomos B e 14,2% dos exemplares com 4 cromossomos B no seu conjunto genômico (Cruzamento Tipo A). No segundo tipo de cruzamento, com ambos os parentais apresentando 3 cromossomos B, a proporção manifestada na geração filial foi de 11% dos indivíduos portando 1 cromossomo B, 21% dos indivíduos apresentando 2 cromossomos B, 42% dos exemplares portando 3 cromossomos B, 16% dos animais portando 4 cromossomos B e 10% apresentando 5 cromossomos B (Cruzamento Tipo B). No terceiro e último tipo de cruzamento, os machos portavam 4 cromossomos B as fêmeas apresentavam 3 cromossomos B, a proporção manifestada na geração filial foi de 4% apresentando 1 cromossomo B, 22% portando 2 cromossomos B, 51% apresentando 3 cromossomos B, 12% portando 4 cromossomos B e 11% apresentando 5

cromossomos B (Cruzamento Tipo C). Estes dados representam a proporção de cromossomos supranumerários transmitida à geração filial. Observou-se, com base nestes cruzamentos, que o número dos cromossomos B manifestado na geração filial nunca excede à somatória dos cromossomos B de seus respectivos parentais.



**Figura 3.** Proporção de cromossomos B manifestada na geração F<sub>1</sub> provenientes de cruzamentos induzidos a partir das respectivas gerações parentais.

O genoma de alguns organismos eucariótico não é composto somente por genes encontrados no conjunto cromossômico A, mas também por elementos supranumerários os quais parecem não obedecer às leis da herança mendeliana (Camacho *et al.*, 2000). Os cromossomos B são fragmentos de DNA dispensáveis, portadores de alguns genes funcionais, exibindo um modelo irregular de transmissão e em muitos casos diminuindo a aptidão dos indivíduos que os carregam (Bakkali *et al.*, 2002).

Informações sobre o padrão de transmissão dos cromossomos supranumerários em peixes portadores são bastante escassos na literatura. Em uma das poucas referências disponíveis Oliveira *et al.* (1997) descreveram resultados de estudos prévios sobre a herança dos cromossomos supranumerários na espécie *Prochilodus lineatus*, tendo observado que a transmissão destes microcromossomos foi consistente com o modelo mendeliano ( $K_B = 0,511$ ). Estes autores estudaram o

padrão de transmissão destes elementos supranumerários na espécie em cativeiro, estabelecendo relações entre o padrão de transmissão e manutenção dos B em populações naturais e na piscicultura, conforme também realizado neste trabalho.

No presente trabalho, observou-se que o padrão de transmissão destes elementos genômicos nas respectivas gerações foi consistente com a expectativa mendeliana ( $K_B=0,48$ ) (tabela 1) reforçando, desta forma, os dados apresentados por Oliveira *et al.* (1997).

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

Tipos de Cruzamentos		Número de cromossomos B na geração F1									Índice de transmissão de B			
$\zeta$	$\text{♀Z}$	0	1	2	3	4	5	6	7	Total	Média de B	$K_B$	Z	P
2	2		7	4	4	2				17	2,0588	0,5147	0,1212	NS
3	3		2	4	8	3	2			19	2,9473	0,4912	-0,076	NS
4	3		1	6	14	3	3			27	3,0370	0,4338	-0,688	NS
Total		0	10	14	26	8	5	0	0	63	2,6810	0,48		

Os valores de  $K_B$  obtidos sobre a frequência dos cromossomos B encontrados nos indivíduos resultantes dos diferentes cruzamentos realizados indicam que a transmissão dos cromossomos B ( $K_B=0,48$ ) para a espécie *P. lineatus* seguiu um padrão de herança mendeliana ( $K_B=0,5$ ). A possibilidade dos B serem acumulados em um dos sexos e eliminados em outro pode não ser regra para o estudo da herança dos cromossomos B nesta espécie. Uma vez que todos os cruzamentos realizados até o presente momento envolveram machos e fêmeas portadoras de cromossomos B. Tal constatação também foi evidenciada por Oliveira *et al.* (1997).

A existência de um padrão de herança mendeliana dos cromossomos B em *Prochilodus lineatus* observada após a reprodução induzida na piscicultura do CEPTA/ICMbio representa o padrão de manutenção dos cromossomos B na população natural do rio Mogi-Guaçu. Conforme já proposto por Cavallaro *et al.* (2000) e Voltolin *et al.* (capítulo 3), os cromossomos supranumerários da população natural do rio Mogi-Guaçu estariam passando por um processo de neutralização.

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

Bakkali *et al.* (2002) analisaram a herança dos cromossomos supranumerários em populações de gafanhotos *Eyprepocnemis plorans*, baseados na expectativa de transmissão mendeliana ( $K_B=0,5$ ). Estes autores estudaram o padrão de transmissão dos cromossomos B1 (originário da população ibérica) de fêmeas desta espécie em três diferentes populações marroquinas, Mechra (próxima a Mechra-bel-Ksiri); SO.DE.A. (próxima a Ksar-el-Kebir) e Simir (entre Ceuta e Tetouan). Após a realização de cruzamentos dirigidos, constataram que a transmissão dos cromossomos B1 na população de Mechra apresentou um processo de acúmulo ( $K_B=0,575$ ) com relação ao padrão de transmissão mendeliano.

Entretanto, esta acumulação não foi observada nas outras duas populações, onde SO.DE.A. apresentou uma transmissão de ( $K_B=0,512$ ) e Smir ( $K_B=0,463$ ). Estes dados confirmaram a existência de diferentes estágios evolutivos para o mesmo cromossomo B em diferentes populações. Sob o modelo de evolução a longo prazo, a população de Mechra apresentou o polimorfismo B1 mais jovem no Marrocos, onde ainda se observa um acúmulo deste tipo de cromossomo supranumerário através das gerações. Nas outras duas populações de gafanhotos o processo de transmissão dos cromossomos B1 mostrou-se neutralizado, seguindo desta forma um padrão mendeliano (Bakkali *et al.*, 2002).

O padrão de transmissão dos cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* foi consistente com a expectativa mendeliana e está relacionado com a fase de neutralização destes supranumerários nas populações selvagens do rio Mogi-Guaçu, conforme proposto por Oliveira *et al.* (1997) e Cavallaro *et al.*, (2000). Considera-se que os dados obtidos reforçam as proposições destes autores e contribuem para o entendimento da dinâmica evolutiva dos cromossomos supranumerários em *P. lineatus* no rio Mogi

## **CAPÍTULO 3**

### **DINÂMICA EVOLUTIVA DOS CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS DE *Prochilodus lineatus* (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE)**

## RESUMO

*Prochilodus lineatus* é uma espécie de peixe formadora de grandes cardumes que empreendem processos migratórios na época de reprodução. Além disso, é uma espécie amplamente explorada e utilizada em projetos de cultura, particularmente no sul do Brasil. O número diplóide de  $2n=54$  cromossomos caracteriza esta espécie, além da presença de até 7 pequenos cromossomos supranumerários que são freqüentemente encontrados nos indivíduos de diferentes populações. Entretanto, a função e o efeito da presença dos cromossomos B no genoma desta espécie constituem elementos de investigação. No presente trabalho realizou-se um estudo da freqüência dos cromossomos supranumerários em *P. lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP comparando-se a freqüência destes elementos genômicos em diferentes estudos e sua ocorrência no período compreendido entre os anos de 1979 a 2007, a fim de constatar a dinâmica do processo de acúmulo ou neutralização da instabilidade mitótica dos cromossomos B nesta espécie. Também foram estudados indivíduos componentes de diferentes cardumes com intuito de averiguar a continuidade do processo de fixação populacional dos cromossomos B de *P. lineatus* no rio. As evidências comparativas mostraram que o processo de acúmulo (invasão) dos cromossomos supranumerários na espécie *P. lineatus* foi bastante marcante no início da década de 80 e atualmente passa por um processo de neutralização. Considera que os dados obtidos em relação à dinâmica populacional destes elementos extras e a averiguação das causas da tendência para a neutralidade da instabilidade mitótica deste tipo de cromossomo entre os representantes desta espécie neste ambiente, podem contribuir com informações para a compreensão da sua origem e dispersão em outras populações de peixes.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Prochilodus* apresenta uma ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras (Reis *et al.*, 2003) e águas sul-americanas, sendo considerados peixes de relevante importância para o comércio e a pesca de subsistência (Mago-Leccia, 1972). Dentre as espécies deste gênero, *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimatá é, certamente, a mais explorada e estudada (Godoy, 1975; Sverlij *et al.*, 1993). De acordo com Godoy (1975), *P. lineatus* é uma espécie comum ao longo da bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. Embora sua ocorrência seja detectada com maior frequência durante a migração reprodutiva, que ocorre entre os meses de outubro a março, exemplares desta espécie podem ser capturados o ano todo ao longo destes rios e na região de Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, São Paulo (Godoy, 1975).

Sob o ponto de vista citogenético, a espécie *P. lineatus* apresenta um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos, sendo o cariótipo formado por 40 cromossomos do tipo metacêntrico e 14 cromossomos do tipo submetacêntrico, com número fundamental igual a 108. Além disso, exemplares desta espécie usualmente podem apresentar até 7 cromossomos supranumerários ou microcromossomos B nas suas células somáticas (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000).

Supranumerários ou cromossomos B representam cromossomos adicionais encontrados em plantas, animais (Jones & Rees, 1982; Jones & Puertas, 1993; Jones, 1995) e em várias espécies de fungos (Mills & McCluskey, 1990; Miao *et al.*, 1991 a, b; Tzeng *et al.*, 1992; Gêiser *et al.*, 1996; Leclair *et al.*, 1996). São usualmente heterocromáticos e apresentam pouca homologia com os cromossomos

do complemento padrão (A), variando em número e morfologia. Devido sua natureza heterocromática, eles são considerados materiais inertes, mas capazes de carregar um pequeno número de genes ou cístrons ativos (Jesus *et al.*, 2003).

Segundo Camacho *et al.* (2000) os cromossomos supranumerários seriam cromossomos adicionais, dispensáveis, que estão presentes em alguns indivíduos de determinadas espécies e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, seguindo, porém um caminho evolutivo próprio.

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar a manutenção dos cromossomos B na população natural. O modelo heterótico (Whitte, 1973) argumenta que a não acumulação dos cromossomos B pode ser mantida porque os efeitos benéficos nos indivíduos hospedeiros são manifestados com um pequeno número de B e o modelo parasítico ou modelo egoísta (Östergren, 1945; Nur, 1966 a, b; Nur, 1977; Jones, 1985; Shaw & Hewitt, 1990) que propõe a manutenção dos cromossomos B por ação de mecanismos de acúmulo, acúmulo meiótico, por exemplo, o qual contrabalança seus efeitos deletérios na forma hospedeira.

A teoria parasítica sugere que os cromossomos B tendem a alcançar um equilíbrio na frequência, que seria contrabalanceado pela perda total dos efeitos danosos na forma hospedeira. Contudo foi mostrado recentemente que o sistema de cromossomo B pode entrar em um estado de não-equilíbrio realizando vários estágios de acúmulo, neutralização e regeneração polimórfica (Camacho *et al.*, 1997). Como parasitas, os cromossomos B poderiam aumentar rapidamente sua frequência tornando-se pesado para o genoma hospedeiro, o qual seria responsável pela supressão do acúmulo de B. Uma vez neutralizado, o B seria condenado à extinção ao menos que uma nova variável de B ocorresse subsequentemente

prolongando o polimorfismo (Camacho *et al.*, 2000). A maioria dos cromossomos B segue este modelo (Bakkali *et al.*, 2002).

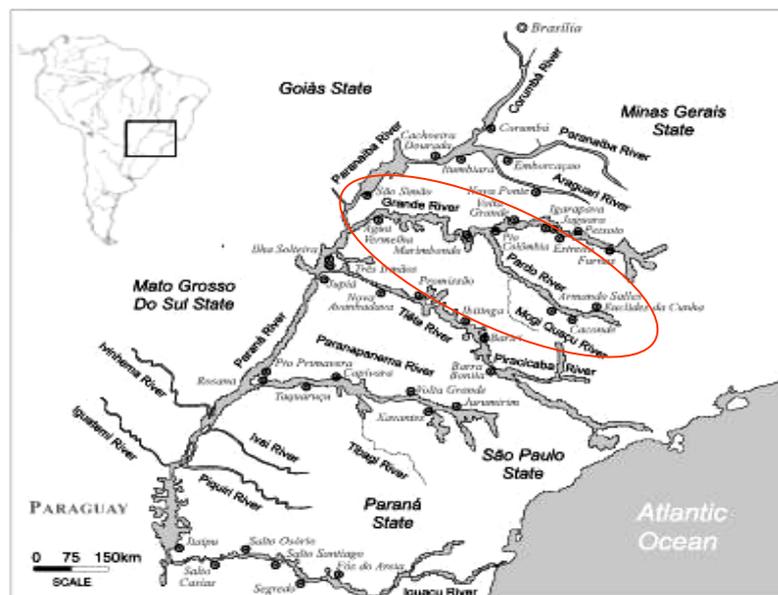
Com base na ocorrência de uma possível neutralização da instabilidade mitótica dos cromossomos B em *Prochilodus lineatus*, proposta previamente por Oliveira *et al.* (1997) e Cavallaro *et al.* (2000), no presente trabalho realizou-se um estudo da frequência dos cromossomos supranumerários em *P. lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, comparando-se a frequência destes elementos genômicos em diferentes estudos e sua ocorrência no período compreendido entre os anos de 1979 a 2007, a fim de constatar a dinâmica dos processos de acúmulo ou neutralização da instabilidade mitótica dos cromossomos B nesta espécie. Além disso, objetivou-se estudar também indivíduos componentes de diferentes cardumes com intuito de averiguar a continuidade do processo de fixação populacional dos cromossomos B na espécie *P. lineatus* presente neste rio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Local de Coleta e Descrição da Espécie*

*P. lineatus* (Teleostei, Characiformes, Prochilodontidae) é uma espécie de peixe abundante na bacia do rio Paraná, especialmente nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (Godoy, 1975) (Figura 1) e tem sido extensivamente utilizada em programas de aquicultura no Brasil. Considerado um animal endêmico na bacia Platina, apresenta alta capacidade de movimentação ao longo dos componentes destas bacias hidrográficas sendo denominado migrador por excelência (Godoy, 1975; Sverlij *et al.*, 1993).

No presente trabalho foram estudados indivíduos componentes de diferentes cardumes totalizando 275 indivíduos coletado da população natural do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP entre os anos de 2003 a 2007. Dentre os exemplares analisados constituíram amostras componentes, três cardumes, os quais foram capturados em dezembro de 2006, em janeiro e março de 2007 Todos estes indivíduos coletados da natureza foram mantidos como estoques reprodutores nas instalações do CEPTA/ICMbio, município de Pirassununga, SP. Para análise dos dados dos exemplares coletados no período de 1979 a 1992, foram utilizados os resultados disponíveis já descritos na literatura segundo Pauls & Bertollo (1983), Cavallaro *et al.* (2000) e Oliveira *et al.* (1997).



**Figura 1.** Representação Geográfica da bacia do rio Paraná aparecendo em destaque os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu.

### *Análises Citogenéticas*

As preparações cromossômicas da espécie em estudo foram realizadas utilizando o método de cultura de linfócitos conforme descrito por Fenocchio & Bertollo (1988), com algumas modificações.

A morfologia cromossômica foi determinada de conformidade com o proposto por Levan *et al.* (1964), com os cromossomos sendo classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a).

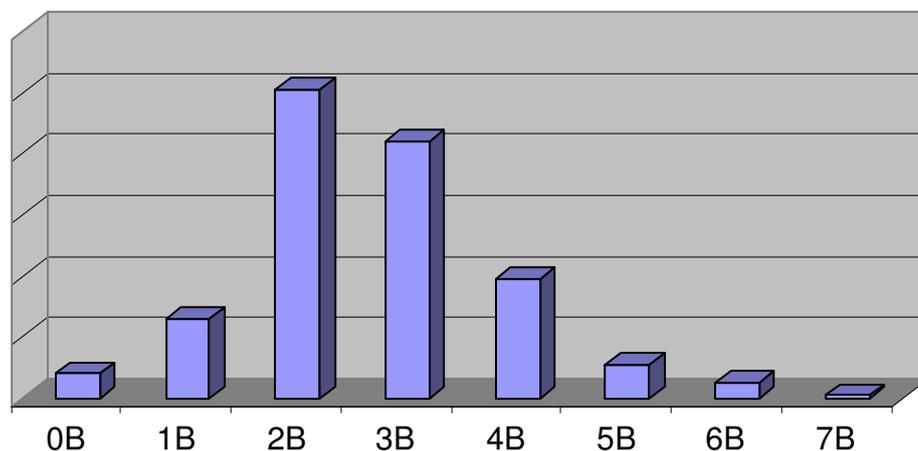
### *Análises Estatísticas*

A frequência dos cromossomos B foi obtida por meio do cálculo da média ponderada. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, a fim de verificar a significância concernente ao aumento ou diminuição da frequência dos cromossomos supranumerários na espécie *Prochilodus lineatus*. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado na análise das diferenças significativas entre a frequência dos cromossomos B nos três diferentes cardumes dessa espécie.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O presente trabalho confirma o número diplóide de  $2n=54$  cromossomos em *P. lineatus*, conforme já observado por Pauls e Bertollo, (1983, 1990), Oliveira *et al.* (1997), Cavallaro *et al.* (2000), Jesus & Moreira-Filho, (2003), Vicari *et al.* (2006) e Artoni *et al.* (2006), além da presença de até 7 microcromossomos supranumerários nos indivíduos das populações analisadas (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000). O número mais freqüentemente encontrado nos

indivíduos desta espécie foi de 2 microcromossomos que representa o número modal. Embora indivíduos com 3 cromossomos tenham se apresentado com frequência elevada. Indivíduos sem cromossomos B e outros com até 7 elementos extras também foram observados (Figura 2).



**Figura 2.** Frequência dos cromossomos B na população natural de *Prochilodus lineatus* proveniente do rio Mogi-Guaçu, exibindo o número modal de 2 microcromossomos supranumerários.

A ocorrência de cromossomos B entre os indivíduos de uma população pode ser esporádica, freqüente, como ocorre com *Prochilodus lineatus* e outras espécies, podendo mostrar uma alta freqüência entre os indivíduos. Além da variação numérica é possível encontrar também variações em relação à morfologia e tamanho desses supranumerários (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Oliveira *et al.*, 1997; Venere *et al.*, 1999; Cavallaro *et al.*, 2000).

A dinâmica evolutiva dos cromossomos B numa dada população parece ser caracterizada por uma rápida invasão ou aumento do número de indivíduos portadores (acúmulo), seguida por um período de pouca variação, determinada pela evolução de genes supressores nos cromossomos A (neutralização), os quais controlariam o acúmulo de cromossomos B (Camacho *et al.*, 1997). Assim ocorreria inicialmente uma fase de acúmulo, seguida pela estabilização em torno de um número modal adaptado para a espécie no ambiente.

Três exemplos são conhecidos a respeito do aumento da freqüência dos cromossomos supranumerários em um curto período de tempo (Riviera *et al.*, 2004). Em um estudo da espécie de gafanhoto *Eypreponemis plorans* foi verificado que o cromossomo parasita B24 recentemente invadiu a população de Torrox (Málaga, sul da Espanha) e mostrou uma mudança significativa na freqüência média de B de 0,34 em 1984 para 0,98 em 1992 e 1,53 em 1994, substituindo o B2 neutralizado (Zurita *et al.* 1998). Em vespas *Trypoxylon albitarse*, a freqüência dos cromossomos B aumentou de 0,133 para 0,962 na população de Nova Ilha (Porto Firme, Brasil), entre 1997 e 1999, sugerindo uma rápida invasão dos cromossomos B (Araújo *et al.*, 2002). No peixe *Prochilodus lineatus*, do rio Mogi-Guaçu, foi verificado um aumento da freqüência de 1,443 para 2,766 em menos de 10 anos (Cavallaro *et al.*, 2000).

Estudos sobre a freqüência de cromossomos B na espécie *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu vêm sendo realizados desde o final da década de 70. As primeiras análises foram feitas por Pauls & Bertollo (1983) e Cavallaro *et al.* (2000) em espécies de *P. lineatus* coletadas de 1979 a 1980 e de 1987 a 1989, respectivamente. Este levantamento mostrou um aumento significativo da freqüência dos cromossomos B de 1,341 para 2,766 durante este período (teste de Mann-Whitney  $z = 5,18$ ,  $P < 0,0001$ ) (Tabela 1). Posteriormente, Oliveira *et al.* (1997) realizaram novo estudo sobre a freqüência dos cromossomos B de *P. lineatus* nesta mesma localidade entre os anos de 1991 a 1992, tendo estes autores observado que a freqüência média dos cromossomos B nos indivíduos sofreu um aumento com relação os dados anteriores para 3,063. Contudo, tal variação não foi considerada significativa (teste de Mann-Whitney  $z = 0,90$ ,  $P = 0,37$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Evolução da freqüência dos cromossomos B na população de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu

Freqüência de cromossomos B											
Ano	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	Total	Freqüência média de B	Referências
1979-80	18	5	13	6	0	2	0	0	44	1.341	Pauls e Bertollo (1983)
1987-89	1	11	22	21	15	7	0	0	77	2.766	Cavallaro <i>et al.</i> (2000)
1991-92	0	0	6	4	5	1	0	0	16	3.063	Oliveira <i>et al.</i> (1997)
2003-2007	8	26	101	84	39	11	5	1	275	2.614	Presente trabalho

Os dados deste trabalho foram comparados com os já descritos na literatura sobre a freqüência dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* (Tabela 2), onde fica evidente nesta análise que houve um aumento significativo da freqüência dos cromossomos B em relação àqueles obtidos por Pauls & Bertollo (1983) nos anos de 1979 a 1980, quando se observou uma freqüência de 1,341 (teste de Mann-Whitney  $z = 5,18$ ,  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2).

Entretanto, ao comparar os dados do presente trabalho com os de Cavallaro *et al.* (2000) pode-se constatar a ocorrência de estabilidade na freqüência dos cromossomos supranumerários nos indivíduos sendo a média de cromossomos agora encontrada de 2,614, semelhante à descrita por aqueles autores de 2,766 (teste de Mann-Whitney  $z = 0,8499$ ,  $P = 0,3953$ ) (Tabela 2). Os dados apresentados no levantamento realizado por Oliveira *et al.* (1997), comprovam a ocorrência da estabilidade mitótica dos cromossomos supranumerários na espécie *P. lineatus* onde o valor médio da freqüência de cromossomos B encontrada foi de 3,063. Os dados constados na tabela 1 revelam que houve uma diminuição da freqüência de cromossomo B na população de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu na

comparação entre as duas últimas análises, mas esta redução não se mostrou significativa (teste de Mann-Whitney  $z= 1,5020$ ,  $P= 0,1330$ ) (Tabela 2).

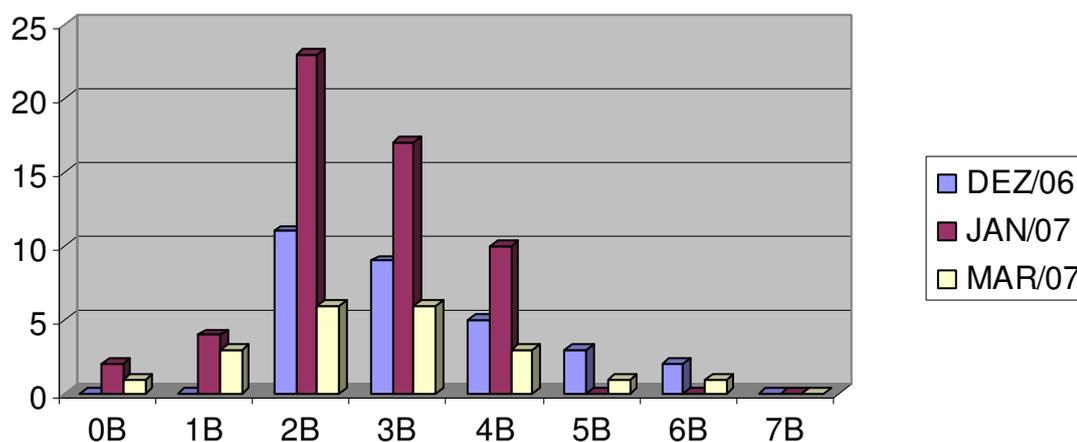
**Tabela 2.** Análise comparativa da frequência dos cromossomos B do presente trabalho com os dados já descritos na literatura a partir do ano de 1979.

Ano	Frequência de B	Z	P	Referência
1979/1980	1,341	<b>5,18</b>	<b>P&lt;0,0001(s)</b>	Pauls & Bertollo (1983)
2003/2007	2,614			Presente trabalho
1987/1989	2,766	<b>0,8499</b>	<b>P=0,3953(ns)</b>	Cavallaro <i>et al.</i> (2000)
2003/2007	2,614			Presente trabalho
1991/1992	3,063	<b>1,5020</b>	<b>P=0,1330(ns)</b>	Oliveira <i>et al.</i> (1997)
2003/2007	2,614			Presente trabalho

Com o intuito de investigar o processo de continuidade da neutralização imposto aos cromossomos supranumerários desta espécie analisou-se a frequência dos cromossomos B de três diferentes cardumes de *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu coletados nos meses de dezembro de 2006, janeiro e março de 2007. Nestes três cardumes observou-se uma estabilização da frequência destes cromossomos B, ou seja, a diferença na frequência dos cromossomos supranumerários nestes diferentes cardumes não foi significativa (teste de Kruskal-Wallis  $H=2,623516$ ,  $DF=2$ ,  $P=0,2993$ ) (Figura 3). Tal homogeneidade entre os diferentes conjuntos populacionais, resultantes em estabilização na frequência dos cromossomos B, poderia ser devido ao fato de se tratar de cardumes migradores coletados em um período bastante próximo, ou este processo poderia estar associado a um intenso fluxo gênico entre estes três grupos.

Em uma segunda hipótese explicativa, a freqüência dos cromossomos B na população de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu encontrar-se-ia em um processo de neutralização, pela suposta ação de genes supressores e o aumento da freqüência somente ocorreria com o surgimento de novas variantes de cromossomos B.

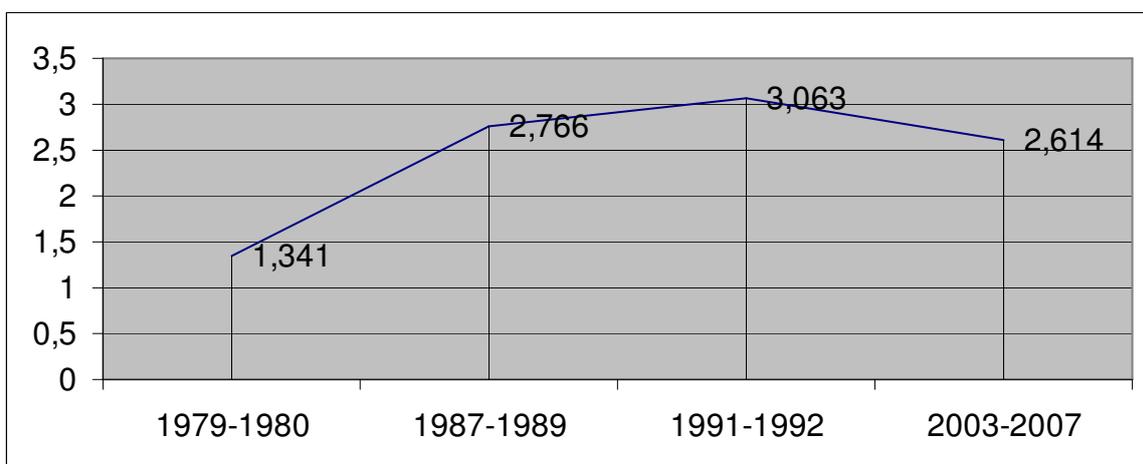
A análise da figura 3 ainda mostra que os cardumes quando considerados separadamente apresentam uma freqüência de cromossomos supranumerários característica, com distribuição diferenciada do número destes elementos nos indivíduos.



**Figura 3.** Freqüência atual dos cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu a partir da análise citogenética de três cardumes.

Os resultados obtidos das análises comparativas dos dados de freqüência indicam que os cromossomos supranumerários da espécie *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu estão passando por um processo de neutralização da instabilidade mitótica, hipótese já previamente proposta por Oliveira *et al.* (1997) e Cavallaro *et al.* (2000), onde tais evidências estão em concordância também com um modelo de evolução em longo prazo para os cromossomos supranumerários proposto por Camacho *et al.* (1997).

Estes autores afirmaram que o processo de estabelecimento e fixação dos sistemas de cromossomos B nas populações e espécies passa por sucessivos estágios, sendo eles, parasita, neutro e novamente parasita em uma dinâmica de não equilíbrio. Existem, pois, concordância deste modelo com o presente caso de *Prochilodus lineatus*, pois o período entre os anos de 1979 e 1980 parece ter sido o cenário para a parte final da rápida invasão dos cromossomos B nas populações da bacia do rio Mogi-Guaçu. Em pouco menos de 10 anos a frequência aumentou de 1,341 (Pauls & Bertollo, 1983) para 2,766 (Cavallaro *et al.*, 2000) nos anos posteriores e ainda para 3,063 (Oliveira *et al.* 1997) sem um aumento não significativo dos cromossomos B nesta última fase. Nos anos de 2003 a 2007 deparou-se com uma diminuição não significativa desta frequência para 2,614. Desta forma, pode-se afirmar que a última grande invasão destes elementos supranumerários parece ter ocorrido na década de 80 e a ausência de acumulação observada por Oliveira *et al.* (1997), Cavallaro *et al.* (2000) e no presente trabalho sugere que a frequência dos cromossomos B desta espécie está se estabilizando em um processo de neutralização (Figura 4).



**Figura 4.** Curva evidenciando o processo de neutralização dos cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu.

Possivelmente, pode-se sugerir que os cromossomos B de *Prochilodus lineatus* revelaram uma origem parasítica, como foi evidenciado nas análises realizadas no período de 1979 a 1992 (Pauls & Bertollo, 1983; Oliveira *et al.*, 1992; Cavallaro, *et al.* 2000) e a partir de então este acúmulo parece ter sido neutralizado conforme confirmado agora, com as análises realizadas no período de 2003 a 2007 relatado neste trabalho. A instabilidade mitótica pode ser importante no estabelecimento inicial do processo de acumulação dos cromossomos B (Jones, 1991), no entanto, no presente caso, uma redução da freqüência dos cromossomos B pode ter sido acompanhada pelo aumento na estabilidade mitótica (Oliveira *et al.*, 1997).

Considera-se, pois, que os dados resultantes deste estudo sobre a dinâmica evolutiva dos cromossomos supranumerários da espécie *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu parece indicar que os elementos B nesta população estão no final de uma fase de um processo de neutralização que resulta em estabilidade mitótica nos indivíduos e na população. Somente o surgimento de novas variantes de B poderia, então, determinar o reaparecimento de novo processo de modificações na freqüência dos cromossomos supranumerários.

## **CAPÍTULO 4**

# **ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS DE *Prochilodus lineatus* (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) DETECTADA A PARTIR DE SONDAS CROMOSSÔMICAS**

## RESUMO

Estudos buscam analisar as seqüências de DNA presentes em cromossomos supranumerários nos organismos portadores no intuito de elucidar a origem e evolução destes elementos genômicos. Análises de DNA descritas para cromossomo B em peixes sugerem predominantemente uma origem intra-específica. Com o intuito de analisar a origem e evolução dos cromossomos B na espécie *Prochilodus lineatus*, foram utilizadas duas sondas construídas a partir de seu genoma, a PM1B, uma sonda específica de cromossomos supranumerários obtida a partir da técnica de microdissecção cromossômica e a sonda PG0B, obtida a partir do genoma total desta espécie. Com a utilização da sonda PG0B, observou-se um compartilhamento de seqüências de DNA entre os cromossomos A e B, principalmente nas regiões centroméricas. Esta evidência é consistente com a hipótese de que certos elementos estruturais são comuns para cromossomos do complemento normal e para os cromossomos B desta espécie. A sonda PM1B, entretanto, apresentou homologia somente com a heterocromatina que compõe as cromátides dos cromossomos B. Os dados são indicação da ausência de homogeneidade estrutural entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento A. Assim, se tais elementos supranumerários tivessem sido originados a partir dos elementos A estes microcromossomos teriam seguido uma evolução independente e intensiva, determinando modificações profundas na seqüência de seu DNA. Por outro lado, não pode ser excluída a possibilidade de uma origem independente ou a partir de doadores externos deste material genético diferenciado no genoma desta espécie, que seguiram, depois, seu processo próprio de diferenciação individual.

## INTRODUÇÃO

Recentemente, seqüências de DNA presentes nos cromossomos B têm sido estudadas em alguns organismos (Camacho *et al.*, 2000). As primeiras análises realizadas nos anos de 1970 e 1980 demonstraram que os cromossomos B continham DNA similar ao encontrado nos cromossomos do conjunto padrão A (Jones & Rees, 1982). Com isso, estudos envolvendo isolamento, clonagem e seqüenciamento de numerosos fragmentos de DNA repetitivos nos cromossomos B de diversas espécies têm sido realizados a partir da década de 90 (Camacho *et al.*, 2000).

Algumas seqüências de DNA são específicas dos cromossomos B, entretanto, outras são compartilhadas com aquelas encontradas nos cromossomos do complemento padrão (A) (Beukeboom 1994; Hackstein *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000, Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006). Os cromossomos supranumerários são tipicamente compostos por seqüências de DNA repetitivas, as quais variam dinamicamente em termos de tipos de repetições e número de cópias (Amos & Dover, 1981; Matzke *et al.*, 1990; Sandery *et al.*, 1990; Eickbush *et al.*, 1992; Zeyl & Green 1992; Wilkes *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003).

O simples fato de seqüências de DNA serem compartilhadas entre os cromossomos A e B nos indivíduos portadores incita à hipótese da origem intra-específica destes cromossomos extras (Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000). Por outro lado, as seqüências de DNA específicas de B podem ter surgido de uma rápida diferenciação e evolução independente, ocasionando a perda de homologia com as seqüências dos cromossomos A dos quais foram derivados (hipótese intra-

específica) (Jamilena *et al.*, 1994, 1995; Houben *et al.*, 1996; Peppers *et al.*, 1997; Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000 entre outros) ou que os cromossomos B tenham sido derivados de cromossomos introduzidos por meio de acasalamentos interespecíficos (hipótese interespecífica) (Sapre & Deshpande, 1987; McVean, 1995; Scharl *et al.*, 1995; Perfectti & Werren, 2001, entre outros). Neste caso existem poucas descrições do surgimento de cromossomos acessórios (Perfectti & Werren, 2001). A maioria das hipóteses, entretanto, tem se estabelecido a partir da idéia de uma origem intra-específica, na qual os cromossomos B são derivados do componente do complemento cromossômico da própria espécie pelo fato de compartilharem seqüências de DNA homólogas (Camacho *et al.*, 2000).

Na busca dos mecanismos de origem e evolução dos cromossomos supranumerários vários estudos concernentes à análise das seqüências de seu DNA têm sido realizados em diferentes organismos como insetos (Eickbush & Werren, 1992; López-León *et al.*, 1994; Cabrero *et al.*, 1999; Perfectti & Werren, 2001), plantas (Cuadrado & Jouve, 1994; Jamilena *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996) e anfíbios (Sharbel *et al.*, 1998), todavia, são escassos os trabalhos relativos às análises das seqüências do DNA nos cromossomos B de peixes.

A ocorrência de cromossomos supranumerários já foi detectada em numerosas espécies de peixes neotropicais, apresentando-se em diferentes tamanhos, na forma de microcromossomos (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Foresti *et al.*, 1989; Oliveira & Foresti, 1993); cromossomos de tamanho médio (Fenocchio & Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000) ou macrocromossomos (Maistro, *et al.*, 1992; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Vicente *et al.*, 1996; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, no prelo).

Com o advento da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) várias sondas cromossômicas vêm sendo produzidas com o intuito de proporcionar um melhor entendimento sobre questões evolutivas, filogenéticas e estruturais, entre outras, no estudo de peixes neotropicais. Dentre as sondas já obtidas têm destaque àquelas relativas a segmentos repetitivos do genoma, como a sonda As51 de *Astyanax scabripinnis* obtida por Mestriner *et al.* (2000), sondas SATH1 e SATH2 de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) obtida por Jesus *et al.* (2003) e a sonda 18S DNAr de *Prochilodus argenteus* obtida por Hatanaka & Galletti (2004).

O método de construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvido e aplicado a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992) tem sido amplamente utilizado em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, esta metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes e a obtenção de sondas específicas de cromossomos supranumerários neste grupo tornou-se uma prioridade na estruturação de mapas genômicos. Até o presente momento, sondas para este tipo de polimorfismo cromossômico, somente foram obtidas por meio da utilização de enzimas de restrição.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi a obtenção de duas sondas a partir do genoma de *P. lineatus*, uma obtida por microdissecção cromossômica do cromossomo B da espécie portadora de 1 de um único elemento e a outra obtida do genoma total de exemplares não portadores de B, no intuito de auxiliar nos estudos sobre a origem e evolução destes elementos supranumerários em *P. lineatus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados exemplares da espécie *Prochilodus lineatus* coletados no rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil. Para o estudo das características cromossômicas, os curimatás foram submetidos à estimulação mitótica (Oliveira *et al.*, 1988) e posteriormente foi obtida suspensão direta de células renais de acordo com método utilizado por Foresti *et al.* (1981).

Para realização da técnica de hibridização *in situ* fluorescente foram utilizadas a sonda específica de cromossomo supranumerário (PM1B) isolada de *P. lineatus* e a sonda de genoma total extraída de preparações cromossômicas de *P. lineatus*. A marcação da sonda específica de cromossomo B foi feita por meio da incorporação de dUTP - Tetramethyl-rhodamine (Roche Diagnostics) pela técnica de PCR. A sonda de genoma total foi marcada com digoxigenina dUTP (Roche Diagnostics) pela técnica de PCR. Após as marcações, procedeu-se a técnica de hibridização utilizada por Porto-Foresti *et al.* (2002). As lâminas foram contracoradas com DAPI.

Já para a obtenção da sonda por microdissecção foi realizada de acordo com Mühlmann *et al.*, (1995) utilizando um microscópio invertido (Nikon) e um micromanipulador manual (5171-Eppendorf) com uma agulha de vidro acoplada, previamente esterilizada. Foram microdissectados cerca de 5 a 10 cromossomos B de um exemplar de *P. lineatus* portador de apenas 1 elemento supranumerário, os quais foram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 0,5 ml da solução para DOP-PCR, que consiste de 14,5 µl água MiliQ, 2 µl de tampão da Thermostequease 10X, 4µl de dNTP (2,5 mM cada) e 2 µl de 2µM *primer* DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNNAT GTG G 3') (Telenius *et al.*, 1992). O tubo com a solução foi aquecido para desnaturação inicial a 90°C, por 10 min. Em seguida,

adicionou-se 2,5 µl de 4U/µl termosequenase (Thermo Sequenase CycleSequencing Kit - USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient da Eppendorf nas seguintes condições: 94°C/3min, 12 ciclos a 94°C/1,5min.; 37°C/2min, 37°C/1s (subindo 0,2°C/s até 72°C); 72°C/2min seguido por 30 ciclos a 94°C/1,5 min.; 62°C/1min; 72°C/1,5 min. Após o DOP-PCR, realizou-se uma PCR convencional com uma reação de 33,5 µl de água miliQ, 5 µl de Tampão para PCR 10X, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de 100 µM DOP *primer*, 0,5 µl de 5U/µl de Taq polymerase e 2 µl do produto DOP-PCR. Por fim realizou-se uma outra PCR para efetuar a marcação desta seqüência específica de DNA utilizando 32,5 µl de água miliQ, 5 µl de tampão para a Taq 10X, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 1µl de dUTP Tetramethyl-rhodamine (Roche Diagnostics), 3 µl de DOP *primer* (100 µM) e 0,5 µl de 5U/µl Taq polymerase. Adicionou-se 2µl do produto da 2ª PCR, totalizando um volume final de 50µl. Tanto a segunda como a terceira PCR foram realizadas nas seguintes condições: 90°C – 3min, 30 ciclos a 90°C – 1min e 30s; 56°C – 1min e 30s; 72°C – 1min e 30s.

Para a extração da sonda genômica, alíquotas (3 µl) do material citogenético de *P. lineatus* foram colocadas em tubo de microcentrífuga e mantidos na estufa a 37°C permitindo a evaporação do metanol. Em seguida, o material (pellet) foi ressuspendido na solução de PCR e as reações foram realizadas de acordo com Telenius *et al.* (1992), com um volume final de 20 µl: 1x tampão da Thermosequenase, 150 µM de cada dNTP e 2 µM do *primer* DOP (5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG -3'). A solução foi aquecida a 90°C por 10 min e posteriormente, adicionado 2 µl da enzima Thermosequenase (4U µl<sup>-1</sup>). O programa da PCR consistiu em: desnaturação inicial a 95°C/3 min e 10 ciclos de 94°C/1,5 min, 30°C/3 min e 72°C aquecido lentamente em 4 min (aproximadamente 0,2°C seg<sup>-1</sup>),

seguidos por 35 ciclos de 94°C/1,5 min, 56°C/1,5 min e 72°C/1,5 min. Alíquotas (2 µl) do produto de PCR foram então marcadas para o procedimento de FISH repetindo 35 ciclos de 94°C/1,5 min, 56°C/1,5 min e 72°C/1,5 min, com a presença de 20 µM de digoxigenina dUTP. Após a PCR, adicionou-se 20 µl da solução de hibridação. A detecção do sinal da sonda genômica foi realizado a partir da anti-digoxigenina-Fluoresceína. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com DAPI e fotografadas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX50, equipado com Epi-Fluorescência.

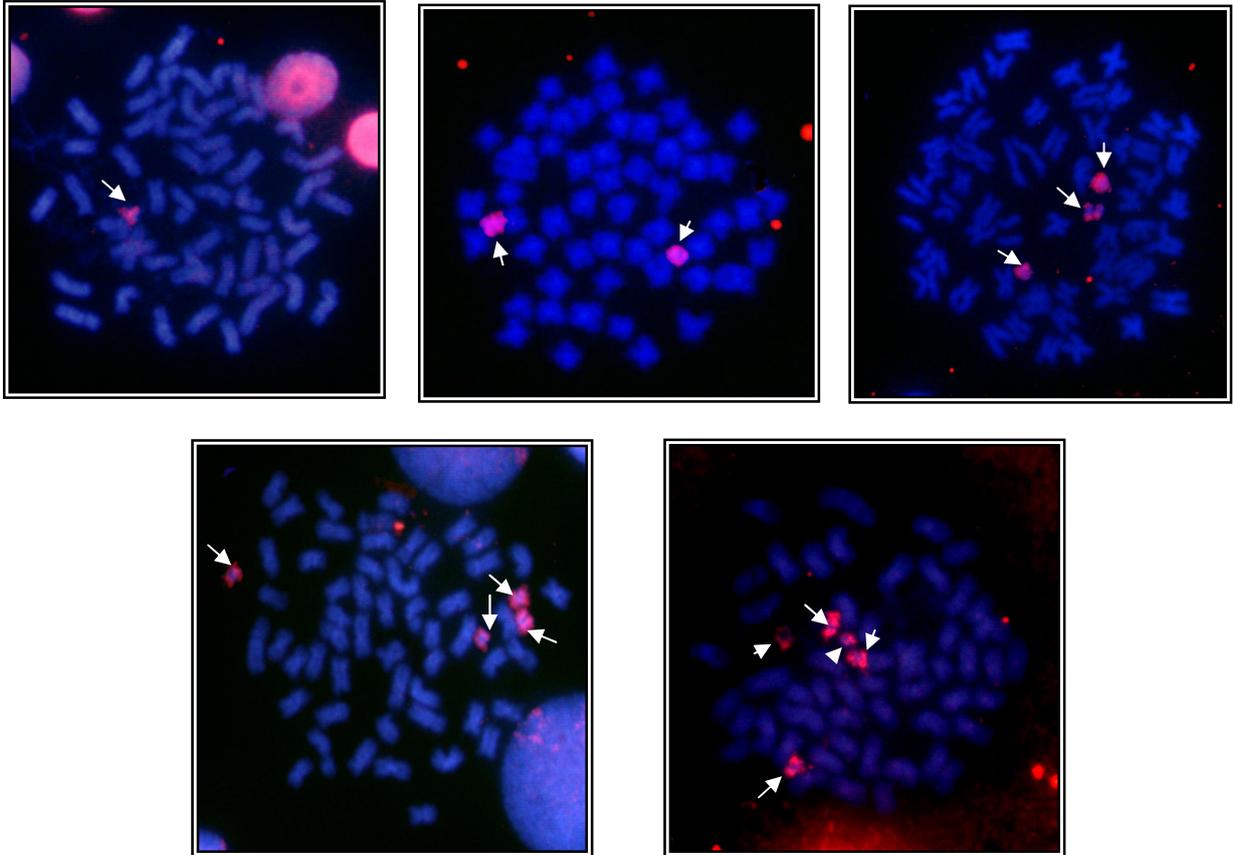
A morfologia cromossômica foi determinada de conformidade com o proposto por Levan *et al.* (1964), com os cromossomos sendo classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram obtidas preparações cromossômicas de 50 exemplares de *Prochilodus lineatus*, sendo identificados indivíduos com cariótipo contendo apenas os cromossomos do complemento A (2n=54 cromossomos), sem cromossomos B. Também foram identificados exemplares com até 7 cromossomos B em suas células somáticas. Tais resultados já eram esperados uma vez que diferentes autores (Pauls e Bertollo, 1983; Oliveira *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 2000; Cavallaro *et al.*, 2000; entre outros) já haviam descrito a ocorrência de até 7 elementos extras do genoma de indivíduos desta espécie de ocorrência na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu.

O resultado da hibridação *in situ* com a sonda específica de cromossomos B denominada de PM1B, revelou homologia apenas com o material genético que compõe as cromátides dos elementos supranumerários da espécie *Prochilodus*

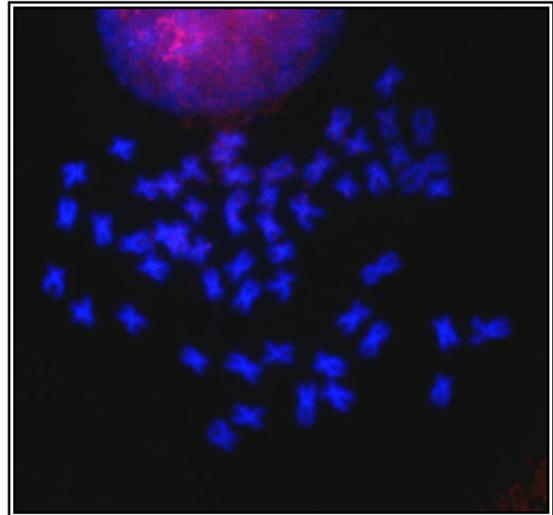
*lineatus*, não tendo sido detectada qualquer associação desta seqüência de DNA com as dos cromossomos do complemento A (Figura 1).



**Figura 1.** Hibridação *in situ* fluorescente com a utilização da sonda PM1B em metáfases somáticas de exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu. Observa-se a marcação fluorescente apenas nos cromossomos supranumerários.

Esta falta de homologia entre os segmentos de DNA presentes nas cromátides dos cromossomos A e B pode ser confirmada através da utilização desta mesma sonda em preparações cromossômicas de indivíduos não portadores de B, onde não foi observado sinal fluorescente referente à presença da sonda PM1B (Figura 2). Tal constatação indicou uma ausência de similaridade entre as seqüências presentes nas cromátides dos cromossomos B, hibridadas com a sonda PM1B, em relação às do complemento A, onde não se detectou sinais desta sonda. Desta forma, pode-se confirmar uma evolução independente destes elementos supranumerários nesta espécie.

**Figura 2.** Hibridação *in situ* fluorescente com a sonda PM1B em preparação cromossômica de um exemplar de *Prochilodus lineatus* não portador de cromossomos B. Nota-se a ausência de marcação com esta sonda nos cromossomos do complemento padrão A.



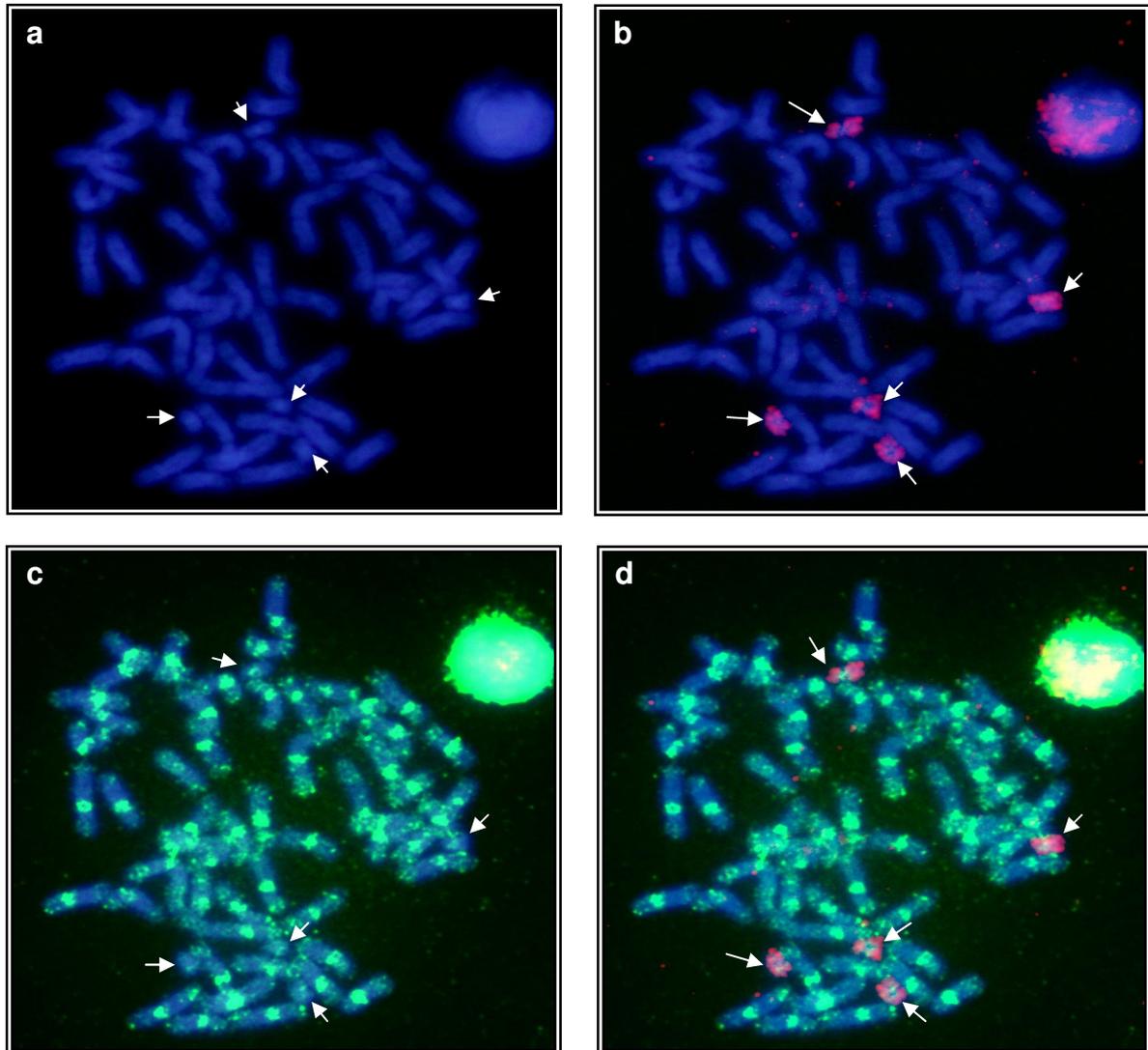
Um aspecto intrigante dos cromossomos B é a obscura definição do seu significado genético em termos de origem, função, propriedades adaptativas e implicações evolutivas para os indivíduos portadores (Bougourd & Jones, 1997).

Vários estudos têm sido realizados objetivando o entendimento da origem e evolução dos cromossomos supranumerários. Em geral, considera-se que estes elementos genômicos possam ter uma origem intra-específica por não-disjunção cromossômica (Volobujev, 1981) ou pela formação de isocromossomos (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006).

Com o intuito de estudar a origem dos cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, realizou-se a hibridação *in situ* com a sonda genômica desta espécie, denominada de PG0B. As preparações revelaram marcações fluorescentes principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos do complemento A e também nas porções centoméricas dos cromossomos supranumerários (Figura 4c-seta).

A aplicação da técnica de *double* FISH com as sondas PG0B e PM1B em exemplares portadores de cromossomos supranumerários revelou sinais de hibridação da sonda PG0B na região centromérica de todos os cromossomos A e também nos centrômeros de seus supranumerários. Entretanto, a sonda PM1B

encontrou homologia apenas nos cromossomos supranumerários (Figura 3d), isto confirma que o padrão de heterocromatina presente nas cromátides dos cromossomos A e B diferem na composição do DNA.



**Figura 4.** Preparações cromossômicas da espécie *P. lineatus* coradas com DAPI (a); sonda PM1B marcou somente os cromossomos B (b); enquanto a sonda PG0B marcou as regiões pericentroméricas de todos os cromossomos do complemento padrão A e também dos cromossomos supranumerários (c); em (d) hibridação dupla (*double FISH*) de metáfase somática utilizando a sonda PM1B (vermelho) e a sonda genômica PG0B (verde).

Mestriner *et al.* (2000), descreveram a composição genética do DNA repetitivo dos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* utilizando a sonda As51, obtida com a utilização da enzima de restrição *KpnI*. O padrão de hibridação *in situ* obtido com a

utilização desta sonda levou os autores a sugerir que a origem dos cromossomos B em *A. scabripinnis* teria sido a partir da formação de isocromossomos, pois seqüências repetitivas em ambos os braços do macrocromossomo B confirmaram os resultados apresentados por Vicente *et al.* (1996), que encontraram característica da heterocromatina do cromossomo B, idênticas às de um par de cromossomos do conjunto A desta espécie.

Jesus *et al.* (2003), ao estudarem as seqüências de DNA dos cromossomos da espécie *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu e principalmente a dos seus cromossomos supranumerários, utilizaram as duas famílias de DNA satélite, SATH1 e SATH2. A localização cromossômica destas famílias de DNA repetitivo, a partir da aplicação de técnica hibridação *in situ* demonstrou que a sonda SATH1, composta de aproximadamente 900 pb, tinha identidade com a região pericentromérica do grupo de cromossomos do complemento padrão, assim como de todos os cromossomos B. Entretanto, a sonda SATH2, de aproximadamente 441 pb, marcou apenas a região pericentromérica dos cromossomos A, não sendo observado em nenhum cromossomo do complemento B. Estes autores também demonstraram que nem todos os segmentos heterocromáticos dos cromossomos B desta espécie eram compostos por DNA SATH1, indicando que outras famílias de DNA repetitivo poderiam ocorrer nos elementos supranumerários. Reafirmaram, contudo, que as similaridades na composição molecular entre os cromossomos A e B poderia sugerir uma origem intra-específica dos cromossomos B nesta espécie.

Artoni *et al.* (2006), ao utilizarem sondas destas mesmas famílias de DNA satélite, SATH1 e SATH2, no estudo de populações distintas de *Prochilodus lineatus*, uma proveniente do rio Mogi-Guaçu, SP e outra oriunda da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, observaram que nos exemplares do rio Mogi-Guaçu, três de quatro

cromossomos B analisados mostraram-se inteiramente composto por SATH1, enquanto o outro B apresentou-se parcialmente marcado com esta sonda. Todavia, na população da lagoa Dourada dois dos três cromossomos B mostraram sinais fluorescentes parciais, enquanto que o cromossomo B restante não apresentou marcações de DNA SATH1. Segundo estes autores, a diferente distribuição da seqüência SATH1 nestas duas populações de *P. lineatus* pode revelar um processo de evolução independente destes elementos supranumerários nos exemplares destas localidades. A sonda SATH2 não apresentou homologia com os cromossomos supranumerários em todos os indivíduos analisados.

No presente trabalho, com a utilização da sonda PG0B, confirmou-se que certas estruturas cromossômicas, como as regiões centroméricas, podem apresentar a mesma identidade estrutural, estando presente tanto nos cromossomos supranumerários como nos do complemento A. Por outro lado, a ausência de simetria de bandas de DNA compartilhadas pelas cromatinas dos cromossomos B com o emprego da sonda PM1B, afasta a possibilidade da origem deste cromossomo B ocorrer a partir da formação de isocromossomo nesta espécie, conforme proposto ocorrer em *P. lineatus* (Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006).

Assim, a origem intra-específica por não disjunção cromossômica poderia ser considerada (Jamilena *et al.*, 1994a, 1995b; Houben *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000; entre outros) para a espécie *P. lineatus*. A ocorrência de diferença entre a composição do DNA da heterocromatina dos cromossomos A e B poderia ser decorrente do fato de que após sua origem por não-disjunção cromossômica, o segmento originário do cromossomo B teria seguido um caminho evolutivo independente, acumulando profundas modificações na seqüência de seu DNA que o teria tornado diferenciado do segmento cromossômico original.

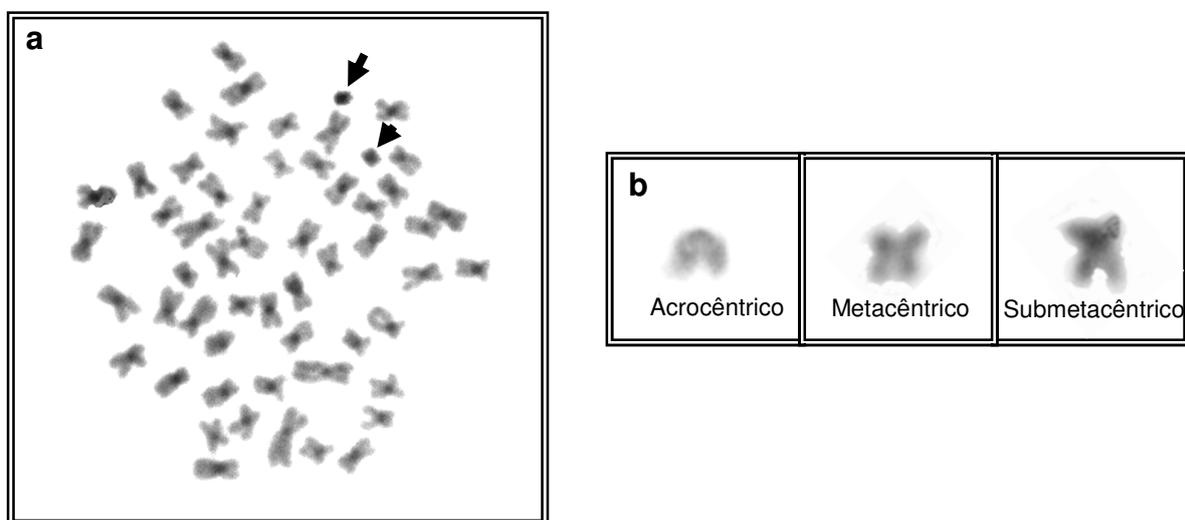
A ausência de identidade entre os cromossomos supranumerários e os do complemento A em *Prochilodus lineatus*, constatada pelos resultados de aplicação da técnica de hibridação *in situ* com a sonda PM1B, resultante da microdissecção de sonda de 1 cromossomo B de exemplar da própria espécie, leva à possibilidade do mecanismo de origem dos cromossomos B ser decorrente de um processo de hibridação interespecífica, conforme descrito em vespas do gênero *Nansonina* por Perfectti & Werren (2001). O elemento novo introduzido seria uma região heterocromática heteróloga ao genoma de *P. lineatus* e a interação teria ocorrido em tempo recente. As modificações estruturais que ocorreram de modo dinâmico na seqüência de DNA estão dando início ao processo de diferenciação dos cromossomos extras, visualizado nas espécies portadores de 2 ou mais cromossomos B (Figura 1).

Não pode ser descartada também a idéia de origem destes elementos extras por um processo alternativo conforme proposto por Foresti (1998) onde tais elementos poderiam surgir ao acaso “*de novo*”, como resultado do processo fisiológico normal das células e serem submetidos ao processo seletivo. Modificações morfológicas e estruturais ocorreram posteriormente.

Um estudo realizado por Maistro *et al.* (2000) utilizando enzima de restrição na análise da estrutura dos cromossomos B em *P. lineatus* sugeriram que os cromossomos A e B diferiram na composição genética, conforme observado também neste trabalho. De acordo com estes autores, os cromossomos B teriam se originado a partir dos cromossomos do complemento padrão A. Contudo de acordo com os autores, o grau de dissimilaridade encontrado para os tipos de heterocromatina sugeriu que a origem dos cromossomos supranumerários não teria sido um evento

recente e que importantes modificações tenham se acumulado durante o processo evolutivo destes elementos estruturais do genoma.

Neste estudo, além da detecção de diferentes seqüências de DNA compartilhadas pelas cromátides dos cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus*, também foram observadas diferenças de morfologia entre estes cromossomos B nos exemplares analisados, sendo observados microcromossomos dos tipos metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntrico (Figura 5b). Como padrão comum todos se apresentaram heterocromáticos quando submetidos à técnica de bandamento C (figura 5a), conforme descrito para indivíduos desta população por Artoni *et al.* (2006). Estes mesmos autores estudaram que exemplares de *P. lineatus* da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, mostraram pequenos segmentos de banda C negativa na região pericentromérica do cromossomo B metacêntrico.



**Figura 5.** Bandamento C em células mitóticas de *Prochilodus lineatus* onde é evidente a condição heterocromática dos cromossomos B (setas) (a). Destaque diferentes morfologias encontradas para os cromossomos B; cromossomo acrocêntrico; cromossomo metacêntrico e cromossomo submetacêntrico (b).

As variações na morfologia e tamanho dos cromossomos B têm sido descritas para várias espécies sendo indicado que um tipo de cromossomo B é predominante em uma determinada população (Jones & Rees, 1982). Em gafanhotos

*Eyprepocnemis plorans*, mais de 40 variantes de cromossomos B já foram descritas. Cavallaro *et al.* (2000) ao estudar os cromossomos supranumerários de *Prochilodus lineatus* em exemplares provenientes de seis diferentes localidades observaram que em todas as populações analisadas foi detectada a presença de cromossomos B polimórfico, tanto em tamanho quanto em morfologia, sendo, contudo, todos de natureza heterocromática. Isto pode indicar que os cromossomos B estão passando por mudanças constantes, que poderiam ocasionar o surgimento de novas variantes de B e aumentando assim, a probabilidade de um novo processo de acúmulo em populações onde a freqüência destes já se encontraria neutralizada (Zurita *et al.*, 1998).

Esta hipótese foi formulada por Cavallaro *et al.* (2000) para a população de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu e confirmada nos resultados apresentados recentemente por Voltolin *et al.* (capítulo 3). No entanto, além destas modificações aparentemente visíveis, as seqüências do DNA destes elementos também vêm sofrendo modificações ao longo do processo evolutivo ao ponto de apresentarem fragmentos de DNA diferentes na sua composição nos indivíduos portadores.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

A espécie *Prochilodus lineatus* é bastante utilizada em programas de piscicultura principalmente na porção sul do Brasil devido sua facilidade de criação e reprodução em cativeiro. Além disso, é considerado um peixe de relevante importância para o comércio e a pesca de subsistência. É denominado um migrador por excelência. A presença deste animal na bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu é expressiva durante a estação reprodutiva a qual compreende os meses de setembro a março. No entanto, exemplares desta espécie podem ser capturados o ano todo em Cachoeira de Emas, município de Pirassununga no Estado de São Paulo.

Estudos citogenéticos da espécie *P. lineatus* têm revelado uma estrutura cromossômica conservada, ou seja, todos os indivíduos analisados até o presente momento apresentaram um conjunto cariotípico composto por  $2n=54$  cromossomos, sendo 40 cromossomos do tipo metacêntrico e 14 cromossomos do tipo submetacêntrico com número fundamental igual a 108. Além de apresentarem até 7 microcromossomos os quais variam em número e morfologia. A presença de 2 cromossomos B foi considerado o número modal para a espécie.

A utilização de marcadores citogenéticos como Giemsa, NOR e Banda C e citogenético-moleculares (FISH) com a utilização de genes ribossomais 5S e 18S revelaram uma estrutura cariotípica bastante conservada para esta espécie. Embora algumas diferenças quanto à localização e distribuição dos genes ribossomais e dos blocos heterocromáticos nos cromossomos dos curimatás do rio Mogi-Guaçu foram observadas quando comparadas aos exemplares de diferentes localidades. Tais

diferenças podem estar associadas a modificações evolutivas que estas seqüências repetitivas vêm sofrendo nesta população.

Os cromossomos supranumerários são considerados elementos dispensáveis presentes no genoma de alguns indivíduos em algumas espécies de animais, plantas e fungos. Estes elementos extras têm ganhado enorme atenção e exaustivos estudos ainda estão sendo realizados no intuito de elucidarem algo sobre sua origem, herança, estrutura do DNA, dinâmica evolutiva e função nos organismos portadores.

Toda e qualquer análise relativa à herança de alguma característica deve ser estudada sob uma expectativa mendeliana. Com base neste contexto foram realizados cruzamentos dirigidos nas matrizes de curimatás provenientes do rio Mogi-Guaçu, onde os resultados demonstraram um padrão de herança mendeliana para os cromossomos supranumerários desta referida espécie. Isto pode estar relacionado a um processo de não-acumulação dos elementos B nesta população, devido à estabilidade mitótica.

Os dados obtidos no presente trabalho, por meio dos cruzamentos realizados na piscicultura serviram como ferramenta bastante útil no entendimento da dinâmica evolutiva destes microcromossomos na população selvagem de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu.

A fim de constatar a dinâmica do processo de acúmulo ou neutralização dos cromossomos supranumerários na espécie *P. lineatus* realizou-se neste trabalho um estudo comparativo da freqüência dos microcromossomos B em *P. lineatus* de ocorrência no rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP entre os anos de 2003 a 2007 comparando-se a freqüência destes elementos genômicos com diferentes estudos já descritos na literatura. Além disto, dentro esta amostragem foram selecionados

indivíduos componentes de diferentes cardumes capturados entre 2006 e 2007 os quais foram estudados citogeneticamente com intuito de averiguar a continuidade do processo de fixação populacional dos cromossomos B de *Prochilodus lineatus* neste rio. As evidências comparativas mostraram que o processo de invasão dos cromossomos supranumerários na espécie *P. lineatus* foi bastante marcante no início da década de 80 e hoje passa por um processo de neutralização.

Desta forma a detecção da herança mendeliana destes cromossomos B em *P. lineatus* observada nos cruzamentos controlados realizado na piscicultura retrata fielmente a condição de neutralidade quanto à presença destes microcromossomos na população natural, pois toda a neutralização cromossômica está associada a uma estabilidade mitótica e esta estabilidade é consequência de uma herança mendeliana.

Uma das melhores formas de analisar a composição do DNA presente nos cromossomos de maneira geral é por meio da construção de sonda do DNA preterido. Inúmeros estudos sobre a estrutura do DNA dos cromossomos supranumerários têm sido realizados com a utilização de sondas diversificadas.

Informações com relação à utilização de sondas para análise da origem e estrutura dos cromossomos B em peixes são escassas na literatura. Com base nesta afirmação realizou-se neste trabalho um estudo da origem e estrutura dos microcromossomos B da espécie *P. lineatus* proveniente do rio Mogi-Guaçu a partir da utilização de duas sondas: a PM1B, caracterizada como uma sonda específica de cromossomos B da espécie *P. lineatus* obtida por meio da técnica de microdissecção cromossômica e a sonda genômica PG0B, obtida a partir do DNA total desta mesma espécie.

Com a utilização da sonda genômica PG0B em preparações cromossômicas de *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu observou-se um compartilhamento das seqüências de DNA entre os cromossomos A e B principalmente nas regiões centroméricas. Esta evidência é consistente com a hipótese de que certos elementos estruturais são comuns para os cromossomos do complemento normal e para os cromossomos B da espécie. Entretanto, a sonda PM1B apresentou homologia somente com a heterocromatina que compõe a cromátide do cromossomo B. Esta ausência de homogeneidade estrutural entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento padrão indica uma evolução independente e intensiva dos elementos supranumerários determinando modificações na sua seqüência de DNA. Além disso, esta mesma sonda não detectou simetria com qualquer cromossomo do complemento A desta espécie afastando a possibilidade da origem deste microcromossomo por formação de isocromossomo.

A ausência de identidade entre os cromossomos supranumerários e os do complemento A em *P. lineatus*, constatada pelos resultados de aplicação da técnica de hibridação *in situ* com a sonda PM1B, de 1 cromossomos B de exemplar da própria espécie, leva à possibilidade do mecanismo de origem dos cromossomos B ser decorrente de um processo de hibridação interespecífica. O elemento novo introduzido seria uma região heterocromática heteróloga ao genoma de *P. lineatus* e a interação teria ocorrido em tempo recente.

Os cromossomos B dos curimatás do rio Mogi-Guaçu também apresentaram variação no tamanho e morfologia isto pode indicar que estes estão passando por mudanças constantes as quais podem ocasionar o surgimento de variantes de B aumentando, desta forma, as chances de novas invasões dos microcromossomos B nessa população onde se encontram neutralizados. Além destas modificações

aparentemente visíveis as seqüências do DNA destes elementos também vêm sofrendo modificações ao longo do processo evolutivo a ponto de apresentarem fragmentos de DNA diferentes na sua composição nos indivíduos portadores.

## 5. CONCLUSÕES

Tendo em vista a problemática com relação à presença dos cromossomos supranumerários em peixes portadores, este trabalho visou contribuir no entendimento sobre a dinâmica evolutiva, herança, origem e estrutura dos microcromossomos da espécie *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP onde podemos concluir que:

- 1** A freqüência quanto ao número dos cromossomos supranumerários dos exemplares de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu apresentou uma variação de até 7 cromossomos B, sendo 2 cromossomos considerado o número modal;
- 2** A média ponderada dos cromossomos B de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu ao longo dos anos apresentou uma diminuição não significativa com relação aos dados de estudos anteriores, podendo constatar que os cromossomos B nesta população se encontram em um processo de neutralização;
- 3** A estabilização mitótica dos cromossomos supranumerários pode ser reafirmada na atual população de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, por meio da análise da freqüência dos cromossomos B em três cardumes migradores entre os anos de 2006 a 2007;
- 4** A análise da herança dos cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu está de acordo com a expectativa mendeliana.

Podendo afirmar que não está ocorrendo um processo de acumulação dos cromossomos B nesta população, isto é, existe uma estabilidade mitótica dos B no rio Mogi-Guaçu para esta espécie;

- 5 Com o emprego da sonda genômica, PG0B, observou-se a existência de um compartilhamento de seqüências de DNA entre os cromossomos A e B principalmente na região centromérica.
- 6 Com o emprego da sonda específica, PM1B, foi observado homologia somente com a heterocromatina que compõe as cromátides dos cromossomos B;
- 7 A ausência de homogeneidade estrutural entre os cromossomos A e B, pode indicar que mesmo se os cromossomos B tivessem se originados do conjunto cromossômico A, estes microcromossomos teriam seguido uma evolução independente com intensivas modificações na seqüência de seu DNA;
- 8 A falta de simetria de bandas de DNA compartilhadas entre os cromossomos A e B afasta a possibilidade do surgimento do cromossomo B desta espécie ser pela formação por isocromossomos;
- 9 Não foi observado identidade entre os cromossomos supranumerários e os do complemento A, leva a possibilidade de um mecanismo de origem dos cromossomos B por um processo de hibridação inter-específica;
- 10 Além das diferenças nas seqüências do DNA nos cromossomos B da espécie *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu pode promover diferenças na morfologia e tamanho destes elementos extras, onde foram encontrados cromossomos do

tipo metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntrico, sendo o metacêntrico a forma mais freqüente;

- 11** Diferenças encontradas na morfologia e seqüência do DNA que compõe os cromossomos supranumerários da espécie *Prochilodus lineatus* podem estar relacionadas a modificações que estes elementos vêm sofrendo ao longo dos anos. Estas alterações podem desencadear a formação de novas variantes de B as quais substituirão o B considerado ancestral promovendo, desta forma, novos processos de invasões na população de curimatás do rio Mogi-Guaçu.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A.A., GOMES, L.C., SUZUKI, H.I., JÚLIO, H.F. (2003) **Migratory fish from the upper Paraná River basin, Brazil** In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A., Ross, C. eds. , *Migratory Fishes of South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*, World Fisheries Trust, the World Bank and the International Development Research Centre, Victoria, p. 19-99
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; STOCKER, A.J.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1996) Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). **Chrom. Res.**, v. 4, p. 301-305.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. (2000) Karyotypic evolution in neotropical freshwater fish. **Chromosome Today**, v.13, p. 169-182.
- ALMEIDA-TOLEDO L.F.; OZOUF-COSTZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO C; PORTO-FORESTI F.; DANIEL-SILVA,M.F.Z (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res.**, v. 97, p. 229-233
- ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I.C. (2002) Cytogenetics Studies in Two Population of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 Chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, v. 67, p.117-2002.

AMOS, A.; DOVER, G. (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma**, v. 81, p. 673-690.

ARAÚJO, S.M.S.R; PAMPOLO, S.G.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. (2002). Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 269, p. 1475-1478.

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 chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. **Genetica**, v. 127, p. 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 Chromosome. **Heredity**, v. 88, p. 14-18.

BARBIERI, G.; SALLES, F.S.; CESTAROLLI, M.A.; TEIXEIRA-FILHO, A.R. (2004) Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.26, p.169-174.

- BAYLEY, P.B. (1973) Studies on migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg 1889 (Pisces, Characoidei), in the River Pilcomayo, South America. **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 25-40.
- BEUKEBOOM, L.W. (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome Conference. **Heredity**, v. 73, p. 328-336.
- BONETTO, A.A.; PIGNALBERI, C. (1964) Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de los peces en los rios mesopotamicos de la republica Argentina. **CONICIT- Instituto Nacional de Limnologia**, v.1, p. 1-14.
- 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**, v. 8, p. 111-118.
- BOUGOURD, S.M.; PLOWMAN, A.B. (1996) The inheritance of chromosome in *Allium schoenoprasum* L. **Chromosome Research**, v.4, p.151-158.
- BOUGOURD, S.M.; JONES, R.N. (1997) B-chromosome: a physiological enigma. **New Phytol.** v.137, p. 43-54.
- BOWEN, S.M. (1983) Detritivory in neotropical fish communities. **Environ. Biol. Fish.** v.9, p.137-144.
- BRITSKI, H.A. (1972) Peixes de água doce do estado de São Paulo. **Sistemática**, v.36, p. 79 -108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. (1998) **Manual de identificação de peixes da região de três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3ª Ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação – CODEVASF, p.115.

BRUM, M.J.I.; MURATORI, C.F.M.L.; LOPES, P.R.D.; VIANNA, P.R.G. (1998) A ictiofauna do sistema lagunar de Marica (RJ). **Acta Biol Leopoldensia**, v.16, p. 45-55.

BUCKUP, P.A., MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. (eds.) ( 2007) **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CABRERO, J.; LÓPEZ-LÉON, M.D.; BAKKALI, M.; CAMACHO, J.P.M. (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v.83, p. 435-439

CAMACHO, J.P.M.; SHAW, M.W.; LÓPEZ-LÉON, M.D.; PARDO, M.C.; CABRERO, J. (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Am. Nat.**, v.149, p. 1030-1050.

CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKBOOM, L.W. (2000) B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.355, p.163-178.

CAPELETI, A.R.; PETRERE, JR. M. (2006) Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall "Cachoeira de Emas" of the Mogi-Guaçu river, São Paulo, Brazil. **Braz. J. of Biol.**, v.66, p. 651-659.

CARLSON, W.R.; ROSEMAN, R. (1992) A New property of the maize B chromosome. **Genetics**, v.131, p.211-223.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. (1980) Desova induzida do Curimatá *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Ciência e Cultura**, v.32, n.9, p.1215-1253.

CASTRO, R.M.C. (1993). *Prochilodus britskii*, a new species of Prochilodontide Fish (Ostariophysi: Characiformes) from the rio Apiacá, river Tapajós system, Mato Grosso, Brazil. **Proc. Biol. Soc. Wash**, v. 106, p. 57- 62.

CASTRO, R.C.M.; VARI, P.P. (2004). **Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study**. Smithsonian Books, Washington, DC, n.622, p.189.

CASTRO, J; VIÑA, A.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. (1996) Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag and CMA3-staining, and fluorescent *in situ* hybridization. **Cytogenet. Cell Genet**, v.75, p. 234-239.

- CAVALLARO, Z.I.; BERTOLLO, L.A.C; PERFCTTI F.; CAMACHO, J.P.M. (2000) Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. **Chrom. Res.**, v.8, p. 627-634.
- CEBRIÁ, A.; NAVARRO, M.L.; PUERTAS, M.J. (1994) Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). **American Journal of Botany**, v.81, p.1502-1507.
- CHIAVARINO, A.M.; ROSATO, M.; NARANJO, C.A.; CÁMARA HERNÁNDEZ, J.; POGGIO, L. (1995) B chromosome polymorfism in N. Argentine population of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter (USA)** v.69, p. 94.
- CHIAVARINO, A.M.; ROSATO, M.; ROSI, P; POGGIO, L.; NARANJO, C.A. (1998) Localization of the genes controlling B chromosome transmission rate in maize (*Zea Mays* SSP. *Mays*, Poaceae). **American Journal of Botany**, v.85, n.11, p. 1581-1585.
- COLE, C.J.; LEAVENS, C.R. (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol**, v.49, p.102.
- CUADRADO, A.; JOUVE, N. (1994) Highly repetitive sequences in B-chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, v.37, p.709-712.

DHERAWATTANA, A.; SADANAGA, K. (1973) Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42 + 2 fragment chromosomes. **Crop Sci.**, v.13, p. 591-594.

DIAS, A.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; (1998) Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). **Caryologia**, v.51, p.105-113

DINIZ, D. (2007) **Origem e Diferenciação do Sistema de Cromossomos Sexuais ZZ/ZW em Triportheus (Characiformes, Characidae). Citogenética, Mapeamento dos Genes Ribossomais e Microdissecção Cromossômica.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 104p.

DONALD, T.M.; HOUBEN, A.; LEACH, C.R.; TIMMIS, J.N. (1997) Ribosomal RNA genes specific to the B chromosomes in *Brachycome dichromosomatica* are not transcribed in leaf tissue. **Genome**, v. 40, p. 674-681.

DROUIN, G.; MUNIZ DE SÁ, M (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p. 481–493.

EICKBUSH, D.G.; EICKBUSH, T.H.; WERREN, J.H. (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. **Chromosoma**, v.101, p. 575-583.

FAP 17., (1992) **Migration and Fish Pass Study**. Fisheries Development Ltd. ODA., London 67p.

FENOCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C (1988) A simple method for fresh – water fish lymphocyte culture. **Braz. J. Genet.**, v.11, p. 847-852.

FENOCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. (1990) Supranumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, v.81, p.193-198.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; CAMACHO, J.P.M. (2000) B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biol**, v.48, p.105-109.

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**, v.124, p.301-306.

FERRO, D.A.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. **Genetica**, v.110, p. 55-62.

FERRO, D.A.M; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, v.119, p.147-153.

FLECKER, A.S. (1996). Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, v.77, p. 1845-1854.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 31, p.137-144.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, A.S. (1989) Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.79, p. 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**, v.49, p. 810-813.

FORESTI, F. (1998) **Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supernumerários em peixes**. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicas. Londrina, Paraná. p.A1.

FRANKS, T.K.; HOUBEN, A.; LEACH, C.R.; TIMMIS, J.N. (1996) The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**, v.105, p.223-230.

GALETTI JR., P.M. (1998) Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v.65, p. 53-56.

GÊISER, D.M.; ARNOLD, M.L.; TIMBERLAKE, W.E. (1996) Wild chromosomal variants in *Aspergillus nidulans*. **Curr.Genet**, v. 29, p.293-300.

GODINHO, A.L.; POMPEU, P.S. (2003) **A importância dos ribeirões para os peixes de piracema.** In: Godinho AL. (Org). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 361-372

GODINHO, H.P. (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicada à aquicultura: bases para o desenvolvimento de Tecnologia de Produção. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v.31, p.351-360

GODOY, M.P. (1959) The age, growth, sexual maturity, migration, tagging and transplanted of the curimba (*Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881), of the Mogi-Guassu river, São Paulo State, Brazil. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v.31, p.447-477.

GODOY, M.P. (1962) **Marcação, migração e transplantação de peixes marcados na bacia do rio Paraná superior.** Arquivos do Museu Nacional, v.52, p. 105-113.

GODOY, M.P. (1967) Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes de rio Mogi-Guassu. **Rev. Brasil. Biol.**, v.27, p.1-12.

GODOY, M.P. (1972) Brazilian Tagging experiments, fishes migration, and upper Paraná river basin ecosystem. **Rev. Bras. Biol.**, v.32, p.473-484.

GODOY, M.P. (1975) **Peixes do Brasil: sub-ordem Characoidei; bacia do rio Mogi Guassu.** Piracicaba, São Paulo: Editora Franciscana, v.4, p.629-847.

GODOY, M.P. (1987) A escada de peixes de Cachoeira de Emas, rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **Com. Mus. Cienc. PUCRS**, v.43, p. 139-151.

GOULDING, M. (1981) **Man and fisheries on an Amazon frontier.** Kluwer Academic Publishers, 137p.

GREEN, D.M. (1990) Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, p.818-824.

HACKSTEIN, J.H.P.; HOCHSTENBACH, R.; HAUSCHTECK-JUNGEN, E.; BEUKEBOOM, L.W. (1996) Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? **BioEssays**, v.18, p.317-323.

HASHIMOTO, D.T.; GONÇALVES, V.R.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. (no prelo) First report of a B chromosome in population of the *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Gen. Mol. Biol.**

- HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p. 239-244.
- HENRIQUES-GIL, N.; SANTOS, J.L.; ARANA, P. (1984). Evolution of complex polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma** v.89, p.290-293.
- HENRIQUES-GIL, N.; SANTOS, J.L.; ARANA, P. (1990) Origin and substitution of B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Evolution**, v.44, p. 747-753
- HERRERA, J.A.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J.; SHAW, M.W.; CAMACHO, J.P.M. (1996) Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v.76, p. 633-639.
- HEWITT, G.M. (1973) Variable transmission rates of a B chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.). **Chromosoma**, v.40, p. 83-106.
- HOUBEN, A.; KYNAST, R.G.; HEIM, U.; HERMANN, H.; JONES, R.N.; FORSTER, J.W. (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). **Chromosoma**, v.105, p. 97-103.

HOWELL, W.M.; BLACK D.A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015.

JAMILENA, M.; RUÍZ-REJÓN, C.; RUÍZ-REJÓN, M. (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. **J. Cell. Sci.**, v.107, p.703-708.

JAMILENA, M.; GARRIDO-RAMOS, M.; RUÍZ-REJÓN, M.; RUÍZ-REJÓN, C.; PARKER, J.S. (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. **Chromosoma**, v.104, p.113-120.

JESUS, C.M.; GALETTI JR. P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. (2003) Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v.118, p.25-32.

JESUS C.M.; MOREIRA-FILHO, O. (2003) Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.56, p. 281-287.

JONES, R.N.; REES, H. (1982) **B Chromosomes**. New York: Academic Press.

JONES, R.N. (1985) **Are B chromosomes selfish? In The evolution of genomesize** (ed.T. Cavalier-Smith), London:Wiley. p. 397-425.

JONES, R.N. (1991). B-Chromosome drive. **Am. Nat.**, v.137, p.430-442.

JONES, R.N.; PUERTAS, M. J. (1993) **The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.)**. In *Frontiers in plant science research* (ed. K. K.Dhir & T. S. Sareen), Delhi: Bhagwati Enterprises, p. 81-112.

JONES, R.N. (1995) Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. **New Phytol.**, v.131, p.411-434.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBREG A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas.**, v.52, p. 201-220.

KAO, T.T. (1990) Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Researches*, v.360, p. 89-104.

KEYL, H.G.; HÄGELE, K. (1971) B chromosome bei *Chironomus*. **Chromosoma**, v.36, p. 403-417

LECLAIR, S.; ANSAN-MELAYAH, D.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M. (1996) Meiotic behaviour of the minichromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. **Curr. Genet.**, v.30, p. 541-548.

LEE M.R.; ELDER, F.F.B. (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogen. Cell Genet.**, v.26, p.36-40.

LESSI, E. (1968). *Aspectos químicos – bromatológicos de Curimatá - Prochilodus scrofa: estudo da fração protéica*. **Rev. da Faculdade de Odontologia de Araraquara.**, v.2, n.1, p. 121-132.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBREG A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas.**, v.52, p. 201-220.

LONG E.O.; DAWID, J.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Ver. Biochem.**, v.49, p.727-764

LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M.; CANO, M.I.; SANTOS, J.L. (1992) A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. **Evolution**, v.46, p.529-539.

LÓPEZ-LÉON, M.D.; VEVES N.; SCHWARZACHER, J.S.; HESLOP-HARRISON, J.S.; (PAT), HEWITT, G.M.; CAMACHO, J.P.M. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chrom. Res.**, v. 2, p. 87-92.

LOWE-MCCONELL, R. (1975). **Fish communities in tropical freshwaters**. New York, Longman. 337p.

LOZANO, R.; REJON, C.R.; REJON, M.R. (1988). A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. **Stain Technology**, v.66, p.335-338.

LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F (1993) Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v.36, p.762-773.

MAGO-LECCIA, F.M. (1972) Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), com uma sinops de la espécies de Venezuela. **Acta Biol.Venez**, v.8, p.35-96.

MAIARDES-PINTO, C.S.R.; PAIVA, P.; ANTONIUTTI, D.M.; VERANI, J.R.; JUSTO, C.L. (1984) **Influência do arraçamento no crescimento do curimatá *Prochilodus scrofa*, em tanques experimentais de cultivo. Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura.** São Carlos, SP, p. 313-327.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; (1992) Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v.87, p.101-106.

MAISTRO L.M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2000) Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. **Genetica**, v.108, p.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 karyotype evolution. **Genetica**, v.109, p.161-168.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. (1999) Chromosomal localization of 5S r DNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chrom. Res.**, v.7, p. 363-367.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica**, v.111, p.439–446.
- MARTÍNEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogen Cell Genet.**, v.73, p149-152.
- MATZKE, M.; VARGA, F.; BERGER, H.; SCHERNTHANER, J.; SCHWEIZER, D.; MAYR, B.; MATZKE, A. J.M. (1990) A 41- 42 tandemly repeated sequence isolated from nuclear envelopes of chicken erythrocytes is located predominantly on microchromosomes. **Chromosoma**, v.99, p.131-137.
- MCVEAN, G.T. (1995) Fractional chromosomes—hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. **BioEssays**, v.17, p. 579-582.

MELTZER, P.S.; GUAN, X.Y.; BURGGESS, A.; TRENT, J.M. (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nature Genetics**, v.1, p. 24-28.

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 isochromosomes. **Heredity**, v.85, p.1-9.

MIAO, V. P.; COVERT, S.F.; VANETTEN, H.D. (1991a) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B-chromosome. **Science**, v.254, p. 1773-1776.

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.**, v.226, p. 214-223.

MILLER, D.A.; DEV. V.G.; TANTRAVASHI, R.; MILLER, O.J. (1976) Supression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Expl. Cell Res**, v.101, p. 235-243.

MILLS, D.; MCCLUSKEY, K. (1990) Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. **Mol. Plant-Microbe Int.**, v.3, p.351-357.

MORAN, P.; MARTINEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.75, p.145-150

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; BERTOLLO, L.A.C. (2001). Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, p.59-64.

MÜHLMANN-DIAZ, M.C.; CHRISTIAN, A.T.; BEDFORT, J.S. (1995) **Chromosome microdissection**. Tenth International Congress of Radiation Research. Wiirzburg, Germany.

NARANJO, C.A.; CHIAVARINO A.M.; ROSATO, M.; QUINTELA FERNANDEZ, E.; POGGIO, L. (1995) **Tamaño Del genoma & polimorfismo para cromosomas B em razas nativas Argentinas y Bolivianas de maiz. Proceeding of III Latin American and XVI Andean Zone of Maize Researchers Meeting (Bolivia)** Tomo II:969-980.

NÉO, D.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. (2000a) Morphological differentiation and possible origin of B chromosome in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.108, p. 211-215.

NÉO, D.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. (2000b). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141.

NORTHCOTE, T.G.; (1984) **Mechanisms of fish migration in fishes.** *In:* J. D. Mcleave ( ed) NATO Conference Series on Marine Sciences, Washington D.C.

NUR, U. (1966a) Harmful B chromosomes in a mealy bug population. **Genetics**, v.54: p.1225-1238.

NUR, U. (1966b) The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. **Genetics**, v. 54, p.1239-1249

NUR, U. (1977) Maintenance of a "parasitic" B chromosome in the grasshopper *Melonoplus femur-rubrum*. **Genetics**, v. 87, p. 499-512.

NUR, U.; BRETT, B.L.H. (1987) Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis (obscurus)*. **Genetics**, v. 115, p. 499-510.

NUR, U.; BRETT, B.L.H. (1988) Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. **Chromosoma**, v.96, p. 205-212.

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**, v.41, p. 227-236.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (1993). Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios**, v.76, p.183-186.

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**, v.79, p.473-476

OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; LEVY, S. (2003) Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus Kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei:Prochilodontidae from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, v.1, p. 47-52.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. (2006) Karyotypic Evolution em *In Neotropical Fishes*. ( Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C; Foresti, F; Kapoor, B.G. Eds) Fish Citogenetics. USA, Science Publishers, p.111-152.

ÖSTERGREN, G. (1945) Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot. Notiser** v.2, p.157-163.

PARKER, J.S.; TAYLOR, S.; AINSWORTH, C.C. (1982) The B chromosome system of *Hypochoeris maculata*. III. Variation in B chromosome transmission rates. **Chromosoma**, v.85, p. 229-310

- PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. (1983) Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.36, p. 307-314.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. (1990) Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of cariotipic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, v.81, p.117-123.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; FREIJE, J.P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.67, p.31-36.
- 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.**, v.5, p. 475-479.
- PERFECTTI, F.; WERREN, J.H. (2001) The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. **Evolution**, v.55, p.1069-1073.
- PETRERE, M. (1985) **Migraciones de peces de agua dulce en America Latina: Algunos comentarios.** FAO COPESCAL Doc Ocas, v.1, p.17.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F. (1997). Estimated frequency of B-chromosome and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in small stream. **Brazil. J. Genet.** v.20, p. 377-380.

PORTO-FORESTI, F. (2001) **Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento.** Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, 119 p

PORTO – FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; TABATA, Y.A; RIGOLINO, M.G.; FORESTI, F. (2002) NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Hereditas**, v.136, p. 227-230.

PUERTAS, M.J. (2002) Nature and evolution of chromosome in plants: a non-cod but information-rich part of plant genomes. **Cytogenet. Genome Res.**, v.96, p. 198-205.

QUIRÓS, R., (1988) **Estructuras para asistir a los peces no salmoídeos en sus migraciones: America Latina.** FAO COPESCAL Doc *TÉC.*, v.5, p. 50.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O; FERRARIS JR. (2003) **Check list of the Freshwater Fishes of South América.** Porto Alegre: Edipucrs, 729p.

RIVIERA, L.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. (2004) Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **J. Evol. Biol.**, v.17, p. 716-719.

ROSETTI, N.; VILARDI, J.C.; REMIS, M.I. (2006) Effects of B chromosome and supernumerary segments on morphometric trait and adult fitness components in

the grasshopper, *Dichroplus elongates* (Acrididae). **J. Comp. European Soc. for Evol. Biol.**, v.20, p. 249-259.

SALVADOR L.B.; MOREIRA-FILHO, O. (1992) B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v.69, p. 50-56.

SANDERY, M.J.; FORSTER, J.W.; BLUNDEN, R.; JONES, R. N. (1990) Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. **Genome**, v.33, p. 908-913.

SAPRE, A.B.; DESHPANDE, D.S. (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. **J. Hered.**, v.78, p. 191-196.

SCHAEFER, S.A. (1998) **Conflict and resolution impact of a new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricaridae)**. *In*: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S.

SCHARTL, M.; NANDA, I.; SCHLUPP, I.; WILDE, B.; EPPLER, J.T.; SCHMIDT, M.; PARZEFALL, J. (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature**, v. 373, p. 68-71

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**, v.41, p.14-22.

SHAW, M. W.; HEWITT, G.M. (1985) The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae).

**Heredity**, v.54, p.259-268.

SHAW, M.W.; HEWITT, G. M.; ANDERSON, D.A. (1985) Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*.

**Heredity**, v.55, p.61-68.

SHAW, M.W.; HEWITT, G.M. (1990) **B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next?** In Oxford surveys in evolutionary biology, vol. 7 (ed. D. Futuyma & J. Antonovics), Oxford University Press. p. 197-223

SUMNER, A.T. (1972) **Chromosome Banding**. Unwin Hyman Inc., Cambridge, 434 p.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y (1996) Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet. Cell Genet**, v.72, p.1-4.

SVERLIJ, S.B.; ROS, A.E.; ORTI, G. (1993) **Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sabalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. *FAO Sinopsis sobre la Pesca*, v.154, p.64.

- TELENIUS, H.; CARTER, N.P.; BEBB, C.E.; NORDENSKYOLD, M.; PONDER, B.A.;  
TUNNACLIFFE, J (1992) Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general  
amplification of target DNA by a single degenerated primer. **Genomics.**, v.8, p.  
718-725.
- TZENG, T. H., LYNGHOLM, L. K., FORD, C. F. & BRONSON, C. R. (1992) A  
restriction fragment length polymorphism and electrophoretic karyotype of the  
fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics**, v.130, p. 81-96.
- VARI, R.P. (1983) **Phylogenetic relationships of the families Curimatidae,  
Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces,  
Characiformes). Smithsonian Contributions to Zoology**, v.378, p.1-60.
- VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.S.; GALETTI JR. P.M. (1999) New cases of  
supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genet Mol Biol**, v.22, p.  
345-349.
- VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. (2005) Comparative cytogenetics  
of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent  
hydrographic basis. **Genet Mol Biol**, v.28, p.103-110.
- VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI  
R.F. (2006). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the  
polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes  
Prochilodontidae). **Genet and Mol Biol**, v.29, p.621-625.

- 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). **Cytogenetic Cell Genet**, v.74, p.70-75.
- VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; E MOREIRA-FILHO, O. (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v4, p.365-369.
- VOLOBUJEV, V.T. (1981) The B-chromosome system of mammals. **Caryologia**, v. 34, p.1-23.
- WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALETTI JR., P.M. (2001) Molecular organization of 5S rRNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, v.44, p.839-902.
- WELCOMME, R.L. (1979) **Fisheries Ecology of Foodplain Rivers**. Longman, Inc., New York.
- WHITE, M.J.D. (1973). **Animal cytology and Evolution**. Third edition, Cambridge University Press: London. 961p.
- WILKES,T.M.; FRANCKI, M.G.; LANGIDGE,P.; KARP, A.; JONES, R.N.; FORSTER, J.W. (1995) Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome**,

ZEYL, C.W.; GREEN, D.M. (1992) Heteromorphism for a highly repeated sequence in the New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. **Evolution**, v.46, p.1891-1899

ZURITA, S.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P.M. (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. **Evolution**, v.52, p. 274-277.