

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO DE *Hypostomus regani* (PISCES: LORICARIIDAE) ATRAVÉS DO MAPEAMENTO FÍSICO DE SEQUÊNCIAS MICROSSATÉLITES.

Julio Henrique Oliva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Camilla Borges Gazolla*,
Luciana Andréia Borin de Carvalho (Co-orientadora), Ana Luiza de Brito
Portela Castro (Orientadora)

Universidade Estadual de Maringá – Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, e-mail:
julioolivahenriq@hotmail.com;

* Universidade Federal do Paraná – Departamento de Genética,
Doutoranda do programa de Pós-Graduação em Genética, Curitiba, PR

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas I (20000006);
Genética (2020005), Genética Animal (20204000)**

Palavras-chave: cariótipo, polimorfismo cromossômico, sequências repetitivas

Resumo

Hypostomus (Loricariidae) são peixes conhecidos vulgarmente como cascudos, amplamente distribuídos pela região Neotropical. Este gênero apresenta uma grande diversidade cariotípica numérica ($2n=64-84$) e estrutural, envolvendo diferenças cromossômicas até mesmo dentro da mesma espécie. Considerado um grupo complexo sob o ponto de vista taxonômico, a citogenética tem contribuído grandemente para identificação de espécies neste gênero. Portanto, o presente estudo teve como objetivo, complementar os dados cariotípicos obtidos previamente para a espécie *Hypostomus regani* coletados no rio Taquari, município de Coxim (bacia do rio Paraguai, MS) utilizando mapeamento físico de sequências microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ pela técnica de Hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Exemplos de *Hypostomus regani* revelaram $2n=72$ cromossomos, porém dois cariomorfos: cariomorfo A contendo $12m+14sm+18st+28a$ e o cariomorfo B constituído por $13m+14sm+17st+28a$. Um heteromorfismo cromossômico foi observado no par 19 do cariomorfo B caracterizado pela presença de um metacêntrico grande e um subtelocêntrico médio, enquanto que no cariomorfo A o par 19 encontra-se em condição homomórfica (subtelocêntricos). FISH com sondas de microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ aplicada aos cariomorfos de *H. regani* revelaram sinais de hibridação nas regiões subterminais na maioria dos cromossomos. No par cromossômico heteromórfico (cariomorfo B), o metacêntrico grande apresentou sinais de hibridações intersticiais com sonda (CA)₁₅ no braço curto e sinais com sonda (GA)₁₅ no braço longo. Estes marcadores contribuíram para diferenciar estruturalmente os cariomorfos A e B de *H. regani* e também identificar sequências repetitivas que possam ter contribuído para este polimorfismo.

Introdução

Hypostomus Lacépède, 1803 é composto por peixes de pequeno a grande porte, conhecidos popularmente como cascudos, compreendendo mais de 130 espécies descritas. Devido à diversidade morfológica, com diferentes padrões de coloração, a identificação dos peixes pelos dados morfológicos não é suficiente para definição do *status* taxonômico de muitas espécies. Assim, a análise citogenética tem contribuído de forma significativa como ferramenta citotaxonômica para o grupo. Estudos citogenéticos neste gênero demonstram grande variação cromossômica ($2n=64$ a 84 cromossomos) e diferenças inter e intraespecífica na estrutura cariotípica. Além da descrição do número diploide e fórmula cariotípica em espécies de *Hypostomus*, a utilização de técnicas mais resolutivas como a citogenética molecular utilizando marcadores específicos, como mapeamento físico de sequências microssatélites $(CA)_{15}$ e $(GA)_{15}$ pela técnica de Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) são importantes para diferenciação entre populações de uma mesma espécie. Portanto, o presente estudo teve como objetivo complementar estudos citogenéticos prévios realizados em uma população de *H. regani* que revelou um interessante polimorfismo cromossômico, envolvendo acréscimos de blocos heterocromáticos, utilizando mapeamento dos cromossomos com sondas de DNA microssatélites para identificar a composição molecular da heterocromatina e seu possível papel na origem do polimorfismo.

Material e métodos

Neste estudo foi utilizado um total de 26 suspensões celulares de exemplares de *H. regani* (8 machos, 4 fêmeas e 4 juvenis). Esta espécie foi coletada no rio Taquari, município de Coxim, Mato Grosso do Sul (MS) e processados na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, unidade de Coxim (FERREIRA, 2016, licença do SISBIO, nº 40510-1). As lâminas foram preparadas conforme descrito em Bertollo et al., (1978). As sondas dos microssatélites $(CA)_{15}$ e $(GA)_{15}$ foram marcadas diretamente com o fluorocromo Cy5 (Sigma Aldrich). Os experimentos de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foram realizados conforme Kubat et al., (2008). A montagem dos cariótipos baseiou-se na classificação de Levan et al. (1964).

Resultados e Discussão

Exemplares de *Hypostomus regani* revelaram $2n=72$ cromossomos, porém dois cariomorfos: cariomorfo A constituído de $12m+14sm+18st+28a$ e o cariomorfo B constituído por $13m+14sm+17st+28a$ (Figura 1). A diferença na fórmula cariotípica se deve a presença de um par heteromórfico ($n^{\circ} 19$) constituído por um metacentrico grande e um subtelocentrico de tamanho médio no cariomorfo B. No cariomorfo A, este par encontra-se em condição homomórfica, ou seja, composto por dois cromossomos subtelocêntricos. O bandeamento C dos cariomorfos A e B realizado nesta espécie revelou

heterocromatina em posições terminais e intersticiais em vários cromossomos (FERREIRA, 2016). Contudo, destaca-se um bloco extenso em todo o braço curto do metacêntrico grande e na região pericentromérica do seu correspondente subteloentrico (par 19 do cariomorfo B) e na região pericentromérica do par 19 do cariomorfo A. FISH com sondas de microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ aplicada nos cariomorfos A (Figura 2A,C) e B (Figura 2B,D) de *H regani* revelaram sinais de hibridação, principalmente nas regiões subterminais da maioria dos cromossomos. No par cromossômico heteromórfico (cariomorfo B), o metacêntrico grande apresentou sinais de hibridações intersticiais no braço curto com a sonda (CA)₁₅ e no braço longo com a sonda (GA)₁₅ e, além dessas marcações foram observadas também bandas subterminais/terminais em ambos os braços do metacêntrico grande (Figura 2, pares em destaque). De acordo com Ferreira (2016) o heteromorfismo cromossômico observado nos indivíduos do cariomorfo B pode ter se originado por meio de uma amplificação de heterocromatina, a partir da região pericentromérica de um dos homólogos do par 19. A presença de sequências microssatélites nas regiões subterminais de vários cromossomos de *H regani* e no metacêntrico grande sugere que estes possam ter contribuído para o heteromorfismo cromossômico detectado, uma vez que a heterocromatina é rica em sequências repetitivas. Em outras espécies de *Hypostomus* tem sido evidenciado pares de cromossomos com heteromorfismo de heterocromatina, como descrito em *H. strigaticeps* por Baumgartner et al. (2014) sugerindo que estas variações são recorrentes no gênero. Portanto, os dados obtidos contribuíram não somente para identificação da natureza das sequências repetitivas em blocos heterocromáticos e que possam estar envolvidos na diferenciação cariotípica em *H. regani*.

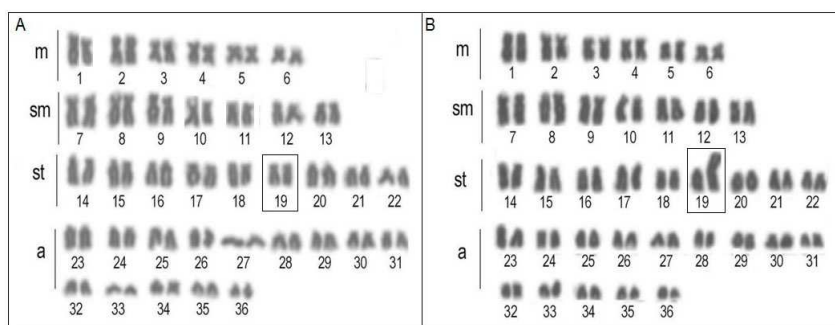


Figura 1 – Cariomorfos A e B *Hypostomus regani* com coloração Giemsa (2n=72).

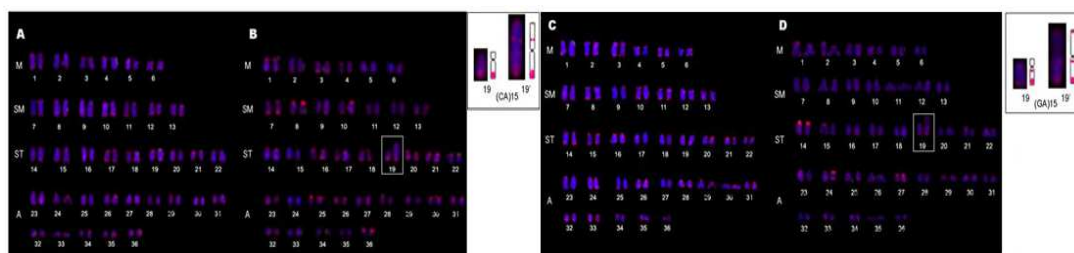


Figura 2 – Cariomorfos A e B após FISH com sondas microssatélites: (A, B) marcações com (CA)₁₅; (C, D) marcações (GA)₁₅. Em destaques, par 19.

Conclusões

A presença de microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ em todo o genoma da espécie de *H. regani*, incluindo o par heteromórfico do cariomorfo B sugere que estas sequências possam estar contribuindo para a origem do polimorfismo envolvendo segmentos heterocromáticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa PIBIC/UEM-CNPq-FA pelo apoio financeiro e ao Prof. Dr. Claudio Henrique Zawadzki pela identificação dos espécimes.

Referências

BAÜMGARTNER L, PAIZ LM, ZAWADZKI CH, MARGARIDO VP, PORTELA-CASTRO AL Heterochromatin polymorphism and physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Parana River Basin, Brazil: Evolutionary and Environmental Correlation. **Zebrafish**, v. 11, n. 5, p. 479-487, 2014.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI C. S., MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 2, p.103-120, 1978.

FERREIRA G. E. B. **Estudos citogenéticos em duas espécies de *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae) da bacia do rio Paraguai: considerações citotaxonomicas e evolutivas.** 2016. 75f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

KUBAT Z., HOBZA R., VYSKOT B., DKEJNOVSKY E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v.51, n.5, p.350-356, 2008

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