CARACTERIZAÇÃO DE DNA REPETITIVO EM ALGUMAS ESPÉCIES DE MEGALOPODIDAE (COLEOPTERA, CHRYSOMELOIDAE)

Jhon Alex Dziechciarz Vidal (PIBIC/CNPq), Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientador), E-mail: almeidamara@uol.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Molecular Estrutural e Genética

Ciências Biológicas, Genética.
Palavras-chave: Citogenetica, DNA repetitivo, C0t-1.

Resumo

Os estudos referentes a citogenética de Megalopodidae é escasso, as quatro espécies analisadas citogeneticamente mostram número cromossômico 2n=20+X+Y. O objetivo deste trabalho foi o mapeamento de DNA repetitivo em *Agathomerus sellatus* e a análise da composição dessas regiões. As lâminas foram coradas com Giemsa 3%. O DNA repetitivo foi obtido pela técnica de C0t-1 e marcado com digoxigenina 11-dUTP (Roche) e detecção por antidigoxigenina rhodamina (Roche) para análise de hibridação *in situ* fluorescente. Adicionalmente, as composições dessas regiões foram analisadas com fluorocromos, as regiões centroméricas mostraram marcações DAPI e CMA3 positivas. Os resultados obtidos mostraram que *A. sellatus* apresenta pouco DNA altamente repetitivo disperso no genoma, sendo encontrado apenas nos cromossomos sexuais, com isso abrindo perspectivas para novos estudos.

Introdução

Na ordem Coleoptera aproximadamente 3.000 espécies foram analisadas citogeneticamente (PETITPIERRE, 1996), um número baixo em relação ao número de espécies presente na ordem (350.000). No entanto, somente 200 espécies de coleópteros apresentam análises mais detalhadas em relação a morfologia cromossômica, mecanismo de determinação sexual (GOLL *et al.,* 2012*)* e análises com coloração diferencial.

As espécies da subfamília Megalopodinae analisadas citogeneticamente, *Agathomerus sellatus* Germar, 1823*, Agathomerus subfasciatus* Germar, 1823*, Agathomerus testaceus,* Klug, 1824 e *Agathomerus marginatus* Klug, 1924 (VIRKKI, 1983, VIDAL *et al*., 2018), possuem número cromossômico 2n=20+X+Y e pouco estudo mais detalhado sobre o grupo.

O DNA repetitivo é considerado uma importante ferramenta para a estruturação dos cromossomos (CHARLESWORTH *et al.*, 1994). Entre as espécies há uma grande variedade de DNA repetitivo (ROZEK *et al*., 2004). Essas sequencias são consideradas bons marcadores citogenéticos, úteis para o estudo da evolução cromossômica, cromossomos supranumerários, cromossomos sexuais e rearranjos cromossômicos (CABRAL-DE-MELLO, MOURA, MARTINS, 2010).

Para melhor análise do DNA repetitivo pode ser utilizado a técnica de C0t-1, a qual é utilizada para obtenção de cópias de sequencias altamente e moderadamente repetitiva de DNA (ZWICK *et al*., 1997). Esta técnica permite uma extensa análise de DNAs repetitivos no genoma, além de compreender a variação da heterocromatina e seus padrões de distribuições nos cromossomos (CABRAL-DE-MELLO *et al.,* 2013).

A técnica de C0t-1 foi utilizada em vários organismos como: Peixes (BLANCO *et al*., 2011), Bivalves (HU *et al*., 2011), Gafanhotos (BUENO; PALACIOS-GIMENEZ; CABRAL-DE-MELLO *et al.,* 2013), Plantas (WEI *et al*., 2005; WEIZHEN; RUI;

GANG, 2006) e Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO *et al*., 2011). Nos grupos evidenciou que a localização do DNA repetitivo é muito variável, até mesmo entre as espécies do mesmo agrupamento.
A utilização de fluorocromos especificos já foram utilizados para compreender a composição de base em regiões de heterocromatina em alguns Coleoptera, este método pode diferenciar melhor a cromatina e seus componentes (MELLO *et al*., 2014). Assim, o uso da técnica de C0T-1 pode demonstrar como é a distribuição do DNA repetitivo em *A. sellatus*, com isso, futuramente poder conhecer como é a distribuição no grupo Megalopodinae. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o mapeamento de DNA repetitivo da espécie *A. sellatus* e a análise da composição dessas regiões.

Material e Métodos

Indivíduos de *Agathomerus sellatus* foram coletados na cidade de Ponta Grossa – PR. A preparação das lâminas foi segundo o método de ALMEIDA, ZÁCARO e CELLA (2000). Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de MURRAY e THOPSON (1980), com modificações.
A prospecção de DNA repetitivo via cinética de reassociação foi baseada na técnica de C0t-1 DNA, segundo ZWICK *et al*. (1997) com modificações. O DNA genômico com concentração final de 222 ng/µL em uma solução de NaCl 0,3 mol/L foi autoclavado (121°C, 1,034 x 10^5 Pa) por 2 minutos e 30 segundos para obter fragmentos entre 100 e 1500 pb. Depois desnaturado a 95°C por 10 min e colocado a 65°C para re-anelamento por 25 minutos, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) com 1U a 37 °C por 8 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos foram usados como sondas para hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A FISH foi realizada a partir do produto de C0t-1 com marcação fluorescente por meio da DOP-PCR utilizando o primer 6MW (5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3') (TELENIUS *et al*., 1992) empregando-se digoxigenina 11-dUTP (Roche) e a detecção por antidigoxigenina rhodamina (Roche).
A técnica de FISH foi realizado segundo PINKEL *et al.* (1986). A técnica de fluorocromos foi segundo SCHWEIZER *et al*. (1983). As melhores mitoses e meioses foram fotografas em um microscópio de epiflurescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 megapixels no programa DP controller.

Resultados e Discussão

Agathomerus sellatus apresenta 2n= 22 cromossomos e número haploide igual a 11. O mecanismo de determinação sexual é X+y, sendo assinápticos na meiose I (Figuras 1B – 1D). Os cromossomos sexuais apresentam tamanho e morfologia semelhante aos autossomos. Estes dados estão de acordo com a descrição realizada por VIRKKI (1983) e VIDAL *et al.* (2018).
Para a realização da técnica C0t-1 foi necessário realizar a padronização do protocolo devido à pequena quantidade de DNA repetitivo no genoma de *A. sellatus*. As variações foram no tempo da autoclave, tempo para re-anelamento do DNA e na quantidade da enzima nuclease S1. Foram realizados vários testes até chegar ao melhor procedimento, para realizar estas mudanças foi necessário revisar o protocolo original de C0t-1 proposto por Zwick *et al.* (1997). Os fragmentos de DNA obtido na autoclave variaram entre 1500bp a 300bp, posteriormente, o DNA submetido a endunuclease S1 resultou em fragmentos de 300bp a 100bp. Este DNA repetitivo foi usado como sonda para mapeamento cromossômico.

A análise de células meióticas de *A. sellatus* submetidas a FISH com sondas de DNA repetitivo mostrou marcações em dois cromossomos. Acredita-se que estes cromossomos marcados possivelmente sejam os cromossomos sexuais (X e Y) (Figuras 1E e 1F), devido ao fato de serem os menores cromossomos do complemento. A pequena quantidade de DNA repetitivo no genoma, restrito aos cromossomos sexuais é muito interessante e abre caminho para novas análises e perspectiva de estudo.

A análise com fluorocromos mostrou que as regiões hibridadas com o DNA repetitivo não contem regiões ricas somente em GC ou AT, não havendo marcações evidentes. Além disso, as regiões centroméricas mostraram marcações DAPI e CMA3 positivas (Figuras 1G e 1H). A hibridação cruzada com a sonda C0t-1na espécie relacionada *A. subfasciatus* não mostrou marcações evidente.

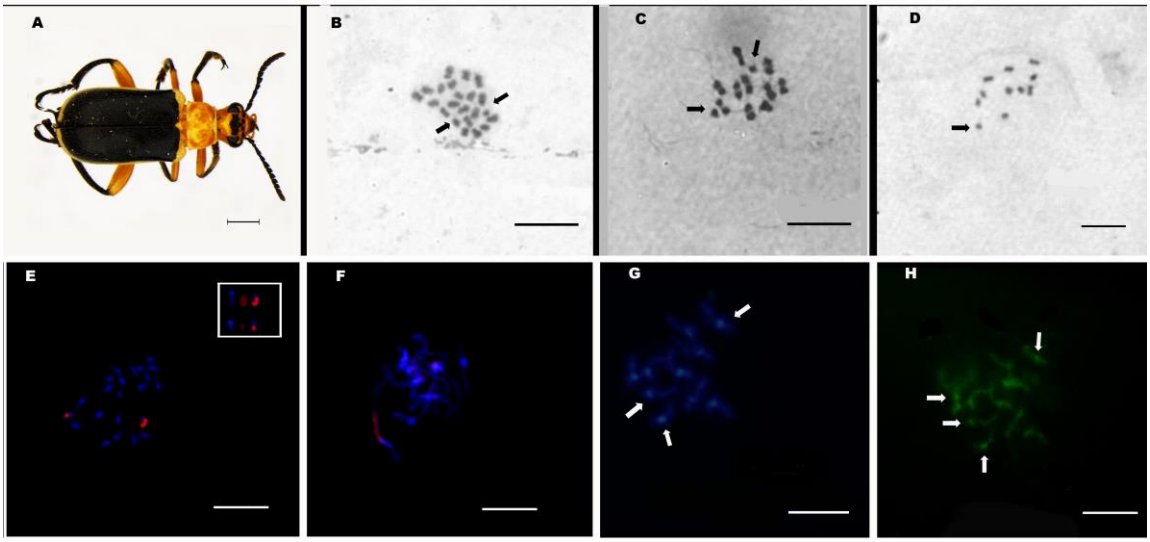


Figura 1: A. Indivíduo macho de *Agathomerus sellatus*, vista dorsal. **B.** metáfase espermatogonial com 2n=22. **C.** metáfases I com 2n=10II+X+y. **D.** metáfases II, com n=11; **E. - F.** células meióticas submetidas a FISH com sonda de DNA repetitivo (Cot-1) (vermelho). **G. – H.** Células submetidas a coloração com fluorocromos CMA3/DA/DAPI. Setas pretas = cromossomos sexuais. Setas brancas marcação CMA3/DA/DAPI.Fig. Escala em **A.**: 2mm. Escala em **B. – H.**: 10 µm.

Conclusão

Os dados obtidos mostram pouca quantidade de DNA repetitivo no genoma de *A. sellatus*, sendo presente apenas nos cromossomos sexuais. Além disso, esse DNA não é rico em uma determinada composição. Diferente da região centromérica dos autossomos que mostrou marcação positiva para ambos os fluorocromos.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e financiamento do projeto. Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Genética e Evolução por toda a estrutura necessária para a realização desta pesquisa.

Referências

ALMEIDA, M. C., ZACARO, A. A., CELLA, D. M, Cytogenetic analysis of Epicauta atomaria (Meloidae) and Palembus dermestoides (Tenebrionidae) with Xy sex determination system using standard staining, C-bands, NOk and synaptonemal complex microspreading technique, **Hereditas** 133, p. 147-157, 2000.

BLANCO, D. R. *et al*. Comparative Cytogenetics of Giant Trahiras Hoplias aimara and H. Intermedius (Characiformes , Erythrinidae): Chromosomal Characteristics of Minor and Major Ribosomal DNA and Cross-Species Repetitive Centromeric Sequences Mapping Differ among Morphologi. **Cytogenetic and Genome Research,** v. 900, p. 71–78, 2011.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper Abracris flavolineata Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 8, 2013.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. *et al*. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of Dichotomius beetles based on chromosomal analysis. **Genetica. Dordrecht: Springer**, v. 139, n. 3, p. 315–325, 2011

CHARLESWORTH, B., SNLEGOWSKI, P., STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature,** v. 371, p. 215-220, 1994.

GOLL, L. G., *et al*. Cytogenetic Analysis of *Lagria vilosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of association of the Xyp sex Chromossomes, **Citogenect and Genome Research,** v. 139, n. 1, p. 29-35, 2012.

HU, L. *et al*. Comparative Cytogenetics Analysis of Chlamys farreri , Patinopecten yessoensis , and Argopecten irradians with C 0 t -1 DNA by Fluorescence In Situ Hybridization. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, p. 7, 2011.

JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. Biology of Chrisomelidae, série entomológica, **Kluwer Academic**, v.42, 623p, 1988.

MELLO, L. R. A.; TASIOR, D.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; Physical map of repetitive DNA and Karyotipe evolution in three species of genus Oophoita (Coleoptera: Alticinae), **Italian Journal of Zoology,** 81:1, 16-24, 2014.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weigth plant DNA. Nucleic Acids Research, **Standford,** v.8, n.19, p.4321-4325, 1980.

ROZEK, E. G.; LACHOWSKA, D.; PETITPIERRE, E.; HOLECOVA, M.; C-bands on chromossomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cnatharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Chrysomelidae and Curculionidae). **Hereditas** 140: 1-10, 2004.

TELENIUS, H. *et al.,* Degenerate Oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer, **genetics**, v. 13. p. 718-725, 1992.

VIDAL, J. A. D. Análise citogenética molecular (FISH) em algumas espécies de Megalopodidae (COLEOPTERA). In: XXVII Encontro Anual de Iniciação Científica IV Encontro Anual de Iniciação Científica Junior, 27., 2018, Ponta Grossa. *Anais...* online, 2018.

WEI, W. *et al*. Karyotyping of Brassica napus L . Based on C 0 t -1 DNA Banding by Fluorescence In Situ Hybridization. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 12, p. 1479–1484, 2005.

WEIZHEN, L. A. N.; RUI, Q. I. N.; GANG, L. I. Comparative analysis of A , B , C and D genomes in the genus Oryza with C 0 t - 1 DNA of C genome. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 14, p. 11, 2006.

VIRKKI, N. Further Chrysomelids with an X+Y sex chromossome system: Megalopodinae. **Hereditas.** v. 98, p. 209-213, 1983.

ZWICK, M. S., *et al*., A rapide procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome,** v. 40, p. 138-142, 1997.