LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DE SONDAS DO DNA RIBOSSOMAL 5S EM *Rineloricaria lima* (ACTINOPTERYGII: SILURIFORMES)

Daiane Santana Marcondes (PIBIC/CNPq/UEPG), Larissa Glugoski, Marcelo Ricardo Vicari, Viviane Nogaroto Vicari (Orientador), e-mail: vivianenogaroto@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área: 2.02.00.00-5 Genética; Subárea: 2.02.04.00-0 Genética Animal

Palavras-chave: FISH, genética animal, rearranjos cromossômicos.

Resumo

Rineloricaria lima é uma das espécies pertencentes à subfamília Loricariinae, a qual se caracteriza por apresentar extensa variação no número diploide (2n), conferindo ampla diversidade cariotípica ao grupo. Nos genomas eucarióticos, encontram-se largamente distribuídos os DNAs repetitivos, tais como o rDNA 5S, os quais constituem pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos. O objetivo deste projeto foi a localização *in situ* de sequências de rDNA 5S isoladas a partir da espécie de *R. lima*. A metodologia envolveu o preparo de células metafásicas de *R. lima*, via coloração por Giemsa, a localização *in situ* cromossômica da sonda de rDNA 5S, por meio da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), e posteriormente a montagem do cariótipo. Para os espécimes estudados foi identificado um número diploide de 2n = 70 cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos, com a presença dos sítios de rDNA 5S localizados na região pericentromérica dos braços curtos dos pares 2, 3, 4, 6, 20 e 30 de cromossomos acrocêntricos.

Introdução

Rineloricaria lima é uma das espécies da subfamília Loricariinae, a qual se caracteriza por apresentar ampla diversidade cariotípica, em virtude dos inúmeros rearranjos cromossômicos e da extensa variação do número diploide (2n = 36 – 70 cromossomos) (BLANCO et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017). Para *R. lima*, um número diploide variável (2n = 66 – 70) foi detectado para duas populações da Bacia do Paraná (ROSA et al., 2012).

O rDNA 5S é organizado em clusters de repetições em tandem, e composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (LONG; DAWID, 1980). É considerado um ponto quente para quebras e rearranjos, e representa uma ferramenta resolutiva em estudos citotaxonômicos e evolutivos, em razão da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados. Rosa e colaboradores (2012) observaram a presença de distintos padrões de distribuição e número de sítios rDNA 5S em cariótipos de *R. lima*. O cariótipo contendo 2n = 70 cromossomos (2st + 68a) e número fundamental (NF) = 72, cujos sítios de rDNA 5S localizavam-se nos braços curtos de cinco pares de cromossomos acrocêntricos, foi considerado o ponto de partida para o atual polimorfismo (ROSA et al., 2012). Symonová et al. (2013) propuseram que em

alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de dispersão dos elementos transponíveis (TEs) para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos. Glugoski et al. (2018) evidenciaram marcações co-localizadas de rDNA 5S e o TE *hAT*, em *Rineloricaria latirostris.* Considerando-se a ampla variação cromossômica presente no grupo, aliada à possível relação entre o rDNA 5S e os TEs, o objetivo deste trabalho foi a localização *in situ* dos sítios de rDNA 5S na espécie *R. lima*, buscando assim contribuir na elucidação da diversificação cariotípica presente neste grupo.

Materiais e Métodos

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada de acordo com Bertollo et al. (1978). A partir das sondas clonadas de rDNA 5S já obtidas em trabalhos anteriores, realizou-se a marcação de sondas de rDNA 5S via reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), utilizando-se digoxigenina 11-dUTP (Roche), como molécula repórter. A localização das sondas de rDNA 5S nos cromossomos foi realizada pela técnica de FISH (PINKEL et al., 1986). As melhores metáfases foram fotografadas no microscópio de epifluorescência e as melhores imagens foram então utilizadas para organizar o cariótipo, nos qual os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos de acordo com Levan et al. (1964).

Resultados e Discussão

A sequência de rDNA 5S utilizada como sonda em ensaios de FISH, apresentou tamanho de 396 pb (Fig. 1) e exibiu identidade média de 86% com regiões de rDNA 5S de *Hypostomus boulengeri* (número de acesso *GenBank* KT943722.1), espécie também pertencente à família Loricariidae, confirmando assim a presença do rDNA 5S no clone analisado. Apesar do gene de rDNA 5S ser altamente conservado, os NTS são variáveis em tamanho e composição, devido a possíveis rearranjos destas sequências, como inversões/deleções (MERLO et al., 2013), o que poderia explicar a obtenção da sonda de 396 pb neste estudo.

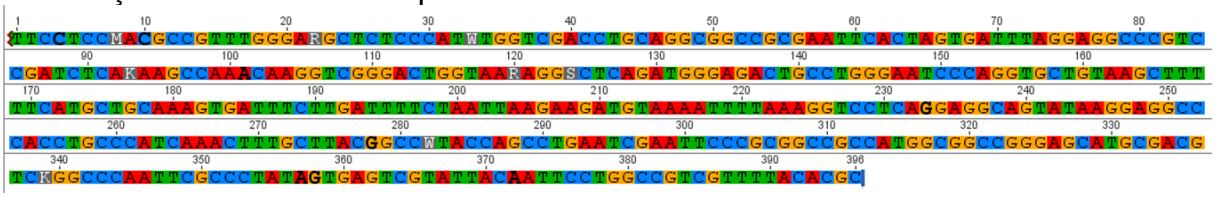


Figura 1. Representação esquemática do rDNA 5S de *R. lima,* proveniente de sequenciamento nucleotídico, correspondente ao fragmento isolado de aproximadamente 396 pb.

Os espécimes de *R. lima* estudados apresentaram número diploide de 70 cromossomos, com fórmula cariotípica 2st+68a e NF = 72. A localização *in situ* evidenciou marcações dos sítios de rDNA 5S em braços curtos, próximos ao centrômero, de 6 pares de cromossômicos acrocêntricos (2, 3, 4, 6, 20 e 30) (Fig. 2).

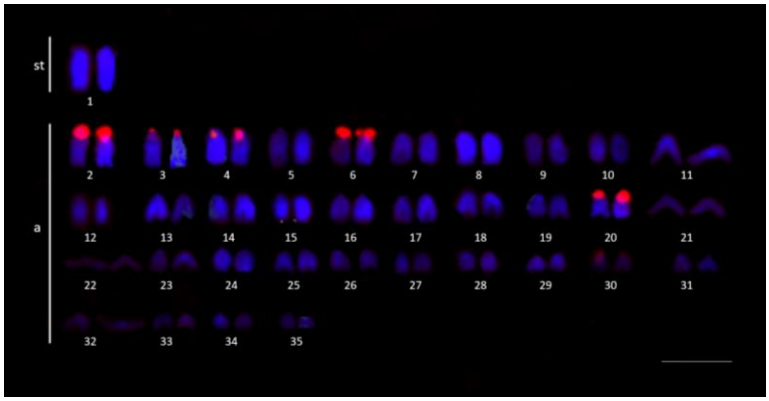


Figura 2: Cariótipo de *Rineloricaria lima* submetido à técnica de FISH, utilizando-se sondas de rDNA 5S (vermelho). Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Barra = 10 µm.

As análises citogenéticas demonstram que os espécimes estudados de *R. lima*, apresentam características comuns ao cariótipo estabelecido por Rosa e colaboradores (2012) e é possível observar que para o mesmo padrão cariotípico, de 2st+68a e NF = 72, houve a presença de 4 sítios cromossômicos de rDNA 5S localizados em mesmas posições para ambos os estudos, ou seja, nos pares acrocêntricos 2, 3, 4 e 6. Neste estudo, o quinto sítio de rDNA 5S, localizou-se no par cromossômico acrocêntrico 20, enquanto que para o estudo comparativo, sua localização foi observada no par acrocêntrico 7. Em adição, nota-se a presença da marcação de um sítio de rDNA 5S a mais para este estudo (par 30), uma vez que ao todo, o cariótipo apresentou seis marcações, diferente do cariótipo estudado por Rosa e colaboradores (2012), onde foram detectadas cinco marcações para *R. lima*. Para a localização *in situ* de sítios de rDNA 5S, foi utilizada como sonda uma sequência de DNA isolada da própria espécie *R. lima*, enquanto Rosa et al. (2012) utilizaram sondas isoladas a partir de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999), o que permitiria assim uma maior sensibilidade da técnica e, consequentemente a detecção de mais sítios de rDNA 5S em *R. lima*, em comparação aos achados de Rosa et al (2012).

As diferenças intraespecíficas significativas encontradas para as posições dos sítios de rDNA 5S são alvo de estudos relacionados a evolução cariotípica, uma vez que os DNAs repetitivos são considerados pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos, devido à sua intensa atividade de descondensação cromossômica, a qual expõe o cromossomo a uma maior suscetibilidade estrutural. Assim sendo, as mudanças nas posições dos sítios de rDNA 5S, assim como a detecção de seu aumento, em número, podem ser resultado de rearranjos cromossômicos secundários (ROSA et al., 2012). Em adição aos rearranjos cromossômicos, a atividade de transposição dos TEs, mesmo que não evidenciada neste estudo, poderia acarretar em mudanças nas posições desses sítios ribossomais, uma vez que estes podem ser carregados pelos TEs (SYMONOVÁ et al., 2013).

Conclusões

Os resultados obtidos por intermédio das análises citogenéticas permitem-nos notar semelhanças cariotípicas entre os espécimes de *R. lima* aqui estudados e àqueles observados na literatura, evidenciadas pela fórmula cariotípica encontrada. A localização *in situ* e distribuição da sonda de rDNA 5S, quando comparada com estudos anteriores, demonstrou a conservação intraespecífica deste sítio, assim como entre as espécies de Loricariidae, e evidenciou ainda, o possível envolvimento

do DNA ribossomal nos eventos de diferenciação e evolução cariotípica para o grupo.

Agradecimentos

À minha orientadora professora Dra. Viviane Nogaroto Vicari, ao professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari e à Larissa Glugoski. Ao PIBIC/UEPG pela concessão da bolsa, Fundação Araucária e CNPq pelo aporte financeiro ao projeto.

Referências

BLANCO D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 351-357, 2012.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O., 1978. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Jounal of. Genetics**, v. 1, p.103–120, 1978.

ERRERO-PORTO, F. et al. Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. **Zebrafish**, v. 11(4), p. 318-324, 2014.

GLUGOSKI, L. et al. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, v. 650, p.49-54, 2018.

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

LONG, E. O; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-64, 1980.

MARTINS, C.; GALETTI, P.M. Jr. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p.363–367, 1999.

MERLO, M. A. et al. The 5S rDNA high dynamism in *Diplodus sargus* is a transposon-mediated mechanism. Comparison with other multigene families and Sparidae species. **Journal of Molecular Evolution** 76: 83–97, 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization**. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, p.2934-2938, 1986.

PRIMO, C. C. et al. Mechanisms of Chromosomal Diversification in Species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 161–168, 2017.

REBORDINOS, L.; CROSS I.; MERLO, A. High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 1-11, 2013.

ROSA, K.O; ZIEMNICZAK, K; BARROS, A.V; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; CESTARI, M.M; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, n.3, p. 739-749, 2012.

SYNONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, SEMBER, A.; STAAKS, G. B. O.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; TÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BCM Evolutionary Biology**, v. 13, n.42, p. 1-11, 2013.