ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DO rDNA 5S DE *Harttia kronei* (ACTINOPTERYGII: SILURIFORMES)

Fernanda Souza de Oliveira (PIBIC/Fundação Araucária), Geize Aparecida Deon, 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: Evolução cariotípica, rearranjos cromossômicos, genética animal.

Resumo

Análises com o gênero *Harttia* evidenciam uma ampla diversidade cariotípica, sendo que a espécie *Harttia kronei* ocupa uma posição basal dentro do gênero. Visto que a presença de regiões com DNAs repetitivos, como sequências *in tandem* das famílias gênicas, contribuem para a ocorrência de quebras e rearranjos cromossômicos, este trabalho teve o objetivo de caracterizar e localizar os sítios de rDNA 5S em *H. kronei*. Foram realizadas análises de sequenciamento nucleotídico e de mapeamento dos sítios de rDNA por hibridação *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*-FISH). O rDNA 5S de *H. kronei* apresentou uma sequência de 595 pb com região de similaridade ao retrotransposon SINE, já o mapeamento por FISH resultou em apenas um sítio em um par de cromossomos.

Introdução

Loricariidae é uma família de peixes de água doce, endêmicos da região Neotropical. Quanto ao gênero *Harttia*, o 2n varia de 52-62 cromossomos (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2006; RODRIGUES, 2010, sendo o 2n basal de 58 cromossomos, com ausência de cromossomos sexuais diferenciados. As análises citogenéticas realizadas por Blanco et al. (2017) para *H. kronei* demonstram que esta espécie apresenta características consideradas primitivas dentro do grupo, como o 2n de 58 cromossomos e ausência de cromossomos sexuais heteromórficos, inferindo que a espécie ocupa uma posição basal dentro do gênero.

Locais com presença de DNA repetitivo são considerados *hotspots* para a ocorrência de quebras e rearranjos cromossômicos (PEVZNER; TESLER, 2003); logo sequências de DNAs repetitivos como os arranjos *in tandem* das famílias gênicas contribuem com a evolução e diversificação do genoma em vertebrados (BRUSCHI et al., 2014; CAZAUX et al., 2011). Em Loricariidae, já foi relatado o envolvimento da família do rDNA 5S como sítio propenso à quebras e rearranjos (GLUGOSKI et al., 2018).

A localização cromossômica do DNA ribossomal 5S em *Harttia* evidencia uma grande variação de suas posições, demonstrando o envolvimento de rearranjos cromossômicos na dispersão destes genes (BLANCO et al., 2017). Blanco et al. (2017) observaram para *H. kronei* apenas um sítio deste gene em um par de

cromossomos; a presença de um único sítio também foi observada para as espécies *H. longipinna*, *H. gracilis* e *H. torrenticola*.

Visto a presença de numerosas diversificações de estruturas cariotípicas em *Harttia*, este trabalho teve como objetivo realizar a análise molecular e a localização *in situ* do rDNA 5S em *H. kronei*, para auxiliar na compreensão sobre a diversidade citogenética presente no grupo, resultante de quebras e rearranjos cromossômicos.

Materiais e Métodos

Foram coletados indivíduos da espécie *H. kronei*, no rio Açungui, bacia do rio Ribeira. A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada de acordo com Bertollo et al. (1978). Amostras de porções de fígado foram utilizadas para extração de DNA, utilizando-se o método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980).

Após verificação da integridade do DNA extraído por eletroforese em gel de agarose 1%, o mesmo foi utilizado como molde em reações de cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*-PCR), com os primers 5s-F (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5s-R (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'). Verificada a presença de bandas de DNA que variaram de 120 – 1200 pb, as mesmas foram isoladas do gel de agarose e ligadas a plasmídeos. Após transformação das ligações em células de *E. coli* DH5-α $CaCl_2$ competentes, foram selecionados os clones recombinantes, os quais foram submetidos ao serviço de sequenciamento nucleotídico. Para identificação de possíveis similaridades dos DNAs repetitivos com aquelas já depositadas em banco de dados, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à análise em base de dados de DNAs repetitivos de referência para sequências repetitivas e TEs.

Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de FISH, descrita por Pinkel et al. (1986), onde foram utilizadas sondas para o gene rDNA 5S marcada por PCR com digoxigenina-11-dUTP.

Resultados e Discussão

O gel de agarose 1% evidenciou a amplificação correta de fragmentos de rDNA 5S de tamanhos esperados de 200, 500 e 1000 pb (Figura 1).

Análises de sequenciamento, evidenciaram que o rDNA 5S de *H. kronei* possui uma sequência de 595 pb e uma região de similaridade ao 5S de *Anolis carolinensis* (Figura 2), além de similaridade com o elemento transponível (TE) SINE (Tabela 1). Essa similaridade com TEs é um importante fator que pode atuar na diversificação e evolução do genoma em peixes, visto que esta região pode estar envolvida com quebras e rearranjos cromossômicos. A presença de um TE associado ao rDNA 5S, em uma região de vestígio de sítio telomérico intersticial pode ter contribuído em rearranjos cromossômicos em Loricariidae (gênero *Rineloricaria*) (GLUGOSKI et al., 2018).

Em relação aos dados da técnica de FISH utilizando-se a sonda para o rDNA 5S, foi observado que este gene apresenta apenas um sítio que está localizado na posição pericentromérica do braço longo de um par de submetacêntricos, resultado também encontrado por Blanco et al. (2017). Essa característica também é compartilhada com outras espécies de *Harttia,* sendo que *H. longipinna*, *H. gracilis,*

H. torrenticola e *H. loricariformis* também apresentam apenas um sítio deste gene, diferentemente do observado para *H. carvalhoi.*

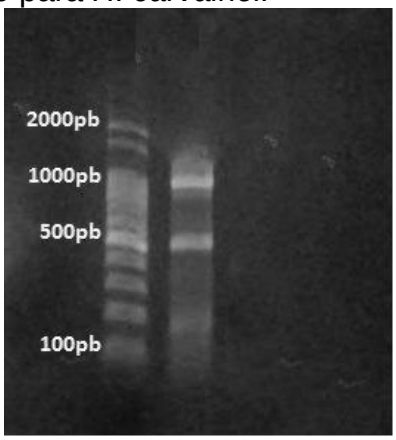


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando bandas de 1000, 500 e 200 pb obtidas de *H. kronei*, utilizando-se como base um marcador de peso molecular de 100 pb.

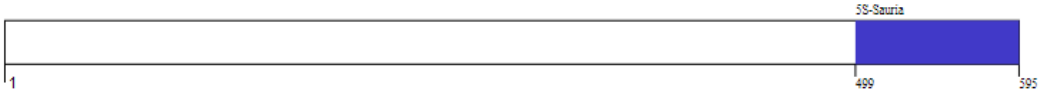


Figura 2 – Representação esquemática da sequência do rDNA 5S de *H. kronei*, evidenciando região de similaridade com o rDNA 5S de *Anolis carolinensis* (em azul).

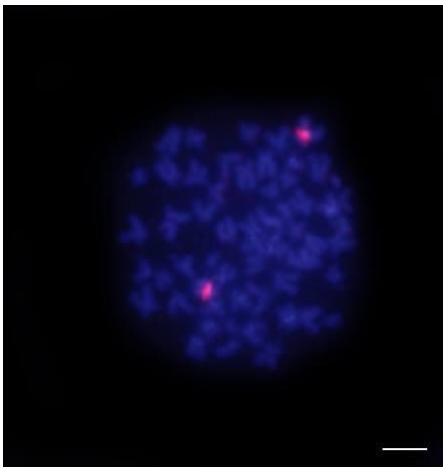


Figura 3 – Localização *in situ* do rDNA 5S em *H. kronei* (vermelho). Barra = 10 µm.

Tabela 1 - Caracterização do rDNA 5S de *H. kronei*, segundo software CENSOR.

Nome	Posição nucleotídica de similaridade do rDNA estudado (pb)	Posição nucleotídica de similaridade ao 5S-Sauria do banco de dados (pb)	Classe	Direção*	Grau de similaridade
rDNA 5S	499 - 595	25 - 121	Não LTR/ SINE/ SINE3	c	0,8866

* Orientação do fragmento repetitivo, onde c indica a fita complementar e d indica a fita direta.

Conclusões

Os resultados demonstram que a amplificação o rDNA 5S para a espécie *H. kronei* gerou três fragmentos (200, 500 e 1000 pb). Os resultados referentes ao sequenciamento demonstraram uma sequência com similaridade ao retrotransposon

SINE, característica considerada importante para a ocorrência de quebras e rearranjos cromossômicos. Quanto aos resultados obtidos com localização *in situ* do rDNA 5S é possível observar que *H. kronei* não apresenta características muito divergentes daquelas encontradas em outros trabalhos, onde pôde ser observado apenas um sítio do rDNA 5S em posição pericentromérica.

Agradecimentos
À minha orientadora professora Dra. Viviane Nogaroto Vicari, ao professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari e à minha co-orientadora Me. Geize Aparecida Deon. Ao PIBIC/Fundação Araucária pela concessão da bolsa e à Fundação Araucária e CNPq pelo aporte financeiro ao projeto.

Referências

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces; Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 2, p. 17-37, 1978.

BLANCO, D. R. et al. Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Armored Catfish Species of the Genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 169–176, 2017.

BRUSCHI, D. P. et al. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

CAZAUX, B. et al. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus Mus (Rodentia, Muridae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY 1 Y 2 sex chromosome system in catfi sh Harttia carvalhoi (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, n. 3–4, p. 320–324, 2006.

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.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, 1980.

PEVZNER, P.; TESLER, G. Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. **Genome research**, v. 13, n. 1, p. 37–45, 2003.

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.

RODRIGUES, R. M. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva.** 2010, 241 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Biologia-Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.