IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Triportheus* sp. (TELEOSTEI: TRIPORTHEIDAE)

Kevin Kriger Gomes de Lima (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Angelita Barth, Roberto Ferreira Artoni, Mateus Henrique Santos (Orientador), e-mail: mateushenrique@yahoo.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Biológicas e Saúde.

Área: Genética (2.02.00.00-5) e subárea: Genética Animal (2.02.04.00-0).

Palavras-chave: Caracterização cariotípica, Cromossomos sexuais, Marcadores cromossômicos.

Resumo

Os peixes representam um grupo de vertebrados muito diverso, uma das famílias de peixes encontradas na região Neotropical é Triportheidae, que representa um grupo monofilético composto por 5 gêneros, dentre eles *Triportheus.* As características biológicas destes organismos são interessantes para estudos genéticos e de evolução, desta forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar citogenéticamente uma população de *Triportheus* sp., do rio Coxim-MS. Para isto, ocorreu a obtenção de metáfases mitóticas e coloração convencional com Giemsa, a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), o bandamento C e a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S. O número diploide obtido foi de 52 cromossomos, heterocromatina centromérica com marcações adicionais no par cromossômico sexual (ZZ/ZW) e nos pares 2, 6, 8 e 20. Ag-RONs no par cromossômico 5. Sítios de DNAr 18S não coincidentes com as Ag-RONs, estando estes presentes no par 3 e em um homólogo do par 8 onde ocorre também marcação de DNAr 5S. Assim, é possível detectar tanto carácteres cromossômicos conservadas quanto únicos em *Triportheus* do rio Coxim-MS.

Introdução

Uma das ordens de peixes mais representativas do Brasil é Characiformes (ARTONI et al., 2000) com cerca de 2.202 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2018a). Dentre as famílias de Characiformes encontra-se Triportheidae com cerca de 21 espécies reconhecidas (ESCHMEYER; FONG, 2018a). Triportheidae compõem um grupo monofilético formado por 5 gêneros, de acordo com Oliveira et al. (2011), entre eles *Triportheus*, composto por aproximadamente 19 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2018b). Cujo cariótipo é bastante conservado, com todas as espécies estudadas exibindo 2n=52 cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Porém ao verificar que *Triportheus* apesar de possuir ampla distribuição geográfica, ainda é pouco estudado citogenéticamente, se evidencia a necessidade de caracterização de suas espécies para estudos citotaxonômicos e de verificação da biodiversidade (VISSOTO et al, 1999), o que justifica o presente trabalho. Que teve como objetivo, portanto, caracterizar citogenéticamente uma população de *Triportheus* sp., coletada no rio Coxim, Mato Grosso do Sul.

Materiais e Métodos

Os espécimes utilizados no presente trabalho foram coletados no rio Coxim, município de Coxim, Mato Grosso do Sul (18° 40.551’ S – 54° 36.510’ WO). Em um total de 9 fêmeas e 2 machos que estão em processo de identificação taxonômica

morfológica e depósito no Museu de História natural do Capão da Imbuia, em Curitiba, Paraná. As metáfases mitóticas foram obtidas utilizando o protocolo de Bertollo; Moreira-Filho e Galetti Jr. (1986). Para a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Já para a detecção da Heterocromatina foi adotado o protocolo proposto por Sumner (1972) utilizando a coloração com iodeto de propídio (LUI et al., 2009). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ocorreu de acordo com o protocolo proposto por Pinkel; Straume e Gray (1986) e foi realizada com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S, cuja amplificação ocorreu por meio de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com marcação através de Biotina 16 DUTP (*Roche applied science)* (18S) e Digoxigenina 11 DUTP (*Roche applied science)* (5S) com as reações adaptadas a cada gene. As lâminas submetidas às técnicas citogenéticas clássicas foram analisadas e fotografadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41e as lâminas da citogenética molecular foram analisadas e fotografadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2. Os cariótipos foram montados com o auxílio do software Adobe Photoshop CC e os cromossomos foram classificados segundo Levan; Fredga, e Sandberg (1964).

Resultados e Discussão

O número diploide obtido para *Triportheus* sp. do rio Coxim foi de 52 cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e a presença de um par de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, caracterizando o sistema ZZ/ZW. (Figura 01). As regiões organizadoras de nucléolo foram simples e presentes no par cromossômico 5 (Figura 01a). O bandamento C revelou sítios heterocromáticos na região centromérica e pericentromérica da maioria dos cromossomos, bem como na região telomérica do braço curto do cromossomo sexual Z e de um homólogo do par 8, além de marcações teloméricas nos braços longos dos pares 2, 6 e 20 e na quase totalidade do cromossomo sexual W (Figura 01b). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou a presença de DNAr 18S na região telomérica dos braços curtos do par 3 e em um homólogo do par 8, o qual também porta o sítio de DNAr 5S (Figura 01c).

O número diploide e o sistema sexual ZZ/ZW verificados para *Triportheus* sp. do presente estudo, condizem com o observado nas demais espécies do gênero (ARTONI et. al. 2001). Além disso, o cromossomo W é subtelocêntrico e bem menor que o cromossomo Z, metacêntrico que permanece conservado entre as espécies de *Triportheus* (BEZERRA, 2007). As regiões organizadoras de nucléolo em *Triportheus* comumente ocorrem em cromossomos sexuais, como foi verificado por Artoni e Bertollo (2002) e Nirchio et al (2007), o que diferiu do observado no presente estudo. A presença de heterocromatina constitutiva centromérica ou pericentromérica em *Triportheus* sp. do presente estudo corrobora ao demonstrado por Yano (2014). Bem como, o fato de o cromossomo W ser rico em heterocromatina é comum e está presente em todas as espécies do gênero (ARTONI et al. 2001). Já o cromossomo Z em geral, exibe sítios heterocromáticos nas regiões terminais de seus braços, como também ocorreu no presente estudo (DINIZ et al. 2008). Os sítios autossômicos de DNAr 18S de *Triportheus* sp. do rio Coxim não coincidem com as regiões de Ag-NOR, como anteriormente verificado por Bezerra (2007). Além disso, não se observam sítios de DNAr 18S no cromossomo sexual W, característica que pode representar uma condição ancestral para *Triportheus* como indicado por Artoni e Bertollo (2002). Já com relação aos sítios de DNAr 5S, percebe-se que estes se co-localizam em sintenia com uma

região de DNAr 18S, como já fora verificado anteriormente para *Triportheus* por Bezerra (2007).

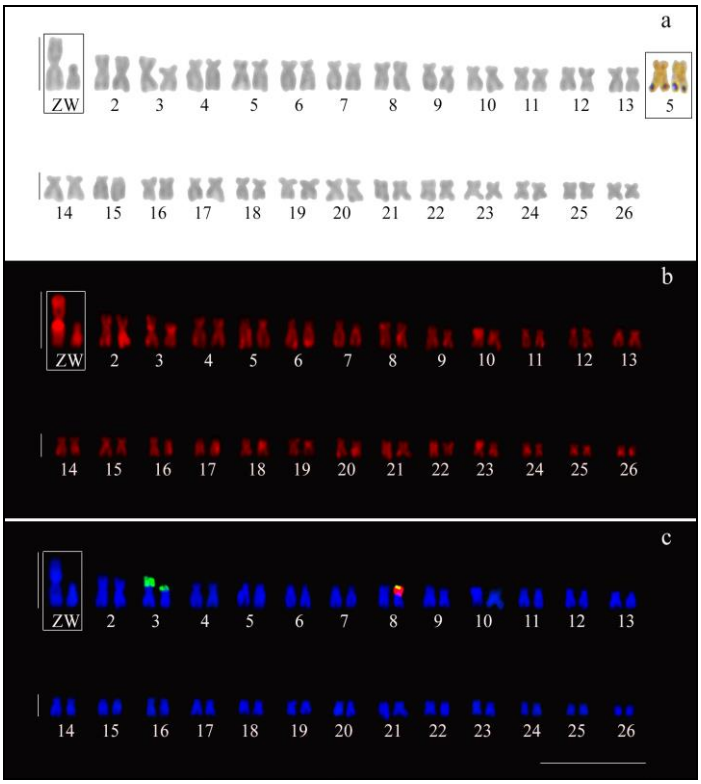


Figura 01 - Cariótipos de *Triportheus* sp. do rio Coxim. Em a, coloração convencional (Giemsa) com destaque (à direita) para os cromossomos marcados com Ag-RONs. Em b bandamento C. Em c, FISH de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde). Barra = 10µm.

Conclusões

A população de *Triportheus* sp. do rio Coxim-MS apresentou tanto características cromossômicas conservadas quanto diferenciais, indicando que se trate de uma população em divergência evolutiva ou mesmo uma espécie nova a ser confirmada por identificação molecular com a metodologia do DNA Barcoding e a análise de caracteres morfológicos.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária, ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e à Universidade Estadual de Ponta Grossa. Também aos professores Doutores Mateus Henrique Santos (orientador) e Roberto Ferreira Artoni e a minha coorientadora, Mestre Angelita Barth.

Referências

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus Triportheus. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, v.89, p.15–19, 2002.

ARTONI, R. F.; FALCÃO, J. N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research**, v.9, p.449-45, 2001.

ARTONI, F. R.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 41-60, 2000.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI, P. M. Jr. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**. v.28, p.153-159, 1986.

BEZERRA, D. D. **ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DO SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW EM *Triportheus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE). CITOGENÉTICA, MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSOMAIS E MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA.** Tese (Doutorado em genética) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2007.

DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Microdissection 1 and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in Triportheus (Teleostei,Characiformes). **Cytogenetics and Genome Research**, v.122, p.163–168, 2008.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes**. Institute for Biodiversity Science and Sustentability. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 28/08/2018a.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes.** Institute for Biodiversity Science and Sustentability. Disponível em < http://www.fishbase.org/Nomenclature/ScientificNameSearchList.php?>. Acesso em: 28/08/2018b.

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

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclatura for Centromeric Position on Chromosomes, **Hereditas,** v.25, n.2, p.201-220, 1964.

LUI, R. L. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**, v.40, n.5-6, p.552–559, 2009.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C.; FERREIRA, I. A.; GRANADO, A.; RON, E. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish Triportheus venezuelensis (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.25–30, 2007.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.;. ORTÍ G.; VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 275, p. 25, 2011.

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.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, n.1, p.304-306, 1972.

VISSOTTO, P. C., FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Science**, v.3, p.1-7, 1999.

YANO, C. F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Chromossomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifucatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the differentiation of the Z and W chromossomes. **PLOS ONE**, v.9, n.6, 2014.