

## Detecção cromossômica do microssatélite (GATA)<sub>n</sub> em espécies/população do complexo *Astyanax bimaculatus*

## Chromosome detection of microsatellite (GATA)<sub>n</sub> in species / population of the *Astyanax bimaculatus* complex

### RESUMO

**Natália Lima Lira (bolsista)**  
[natalia.limalira@hotmail.com](mailto:natalia.limalira@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

**Sandro Tonello**  
[sandrotonello@gmail.com](mailto:sandrotonello@gmail.com)  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

**Heleno Brandão**  
[helenob@utfpr.edu.br](mailto:helenob@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

**Daniel Rodrigues Blanco (orientador)**  
[danielrblanco@utfpr.edu.br](mailto:danielrblanco@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

O mapeamento físico, por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), vem sendo utilizado com grande frequência em estudos citogenéticos de peixes neotropicais por auxiliar na resolução de problemas de ordem taxonômica, biogeográfica e filogenética. Este trabalho tem como objetivo realizar a detecção cromossômica do microssatélite (GATA)<sub>n</sub> em espécies/população cultivadas e naturais do complexo *Astyanax bimaculatus* coletados na região de influência do Lago de Itaipú. Os espécimes foram coletados e transportados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Santa Helena. Nos cromossomos, a sequência (GATA)<sub>n</sub> foi mapeada usando FISH, sob estringência de 77%, e a sonda foi obtida e marcada via PCR. Os resultados revelaram a presença deste elemento repetitivo disperso pelos cromossomos de todas as populações analisadas, com pelo menos um par de cromossomos metacêntricos marcados na porção pericentromérica em todas as espécies/populações. Pelo fato de outros autores terem encontrado a sequência de microssatélite (GATA)<sub>n</sub> com distribuição diferente da encontrada por nós para as populações analisadas no presente trabalho, podemos inferir que esta sequência é um excelente marcador cromossômico em *Astyanax*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lambari. Sondas DNA. Citogenética.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



### ABSTRACT

The physical mapping by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has been used with great frequency in cytogenetic studies of Neotropical fishes, to assist in the resolution of taxonomic, biogeographic and phylogenetic problems. This work aims to perform the microsatellite chromosome detection (GATA)<sub>n</sub> in cultivated and natural species / population of the *Astyanax bimaculatus* complex collected in the region of Itaipú Lake influence. The specimens were collected and transported alive to the Ichthyology and Limnology Laboratory of Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Santa Helena Campus. On chromosomes, the sequence (GATA)<sub>n</sub> was mapped using FISH under 77% stringency, and the probe was obtained and labeled by PCR. The results revealed the presence of this repetitive element dispersed by the chromosomes of all analyzed populations, with at least one pair of metacentric chromosomes marked in the pericentromeric portion in all species / populations. Because other authors have found the microsatellite sequence (GATA)<sub>n</sub> with a different distribution than that found by us for the populations analyzed in the present work, we can infer that this sequence is an excellent chromosomal marker in *Astyanax*.

**KEYWORDS:** Lambari. DNA probes. Cytogenetics.

## INTRODUÇÃO

Atualmente o gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes: Characidae) compreende um táxon polifilético, possuindo espécies muito similares e limites taxonômicos com poucos detalhes, dificultando o reconhecimento e a organização de relações filogenéticas dentro deste gênero (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). Apresenta grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares (morfologicamente crípticas), o que torna *Astyanax* um grupo complexo ao nível taxonômico, dificultando a compreensão acerca da diversidade.

Estão sendo utilizados em estudos evolutivos vários tipos de classes de DNA satélites que, a princípio são isolados a partir do genoma de outros animais, sendo utilizados também para análises em peixes neotropicais. Uma dessas classes é a Banded Krait Minor (Bkm), que pode ser identificada em organismos eucariotos, estando bem distribuída, e não é detectada em procaríotos. A Bkm possui como maior constituinte a repetição de tetranucleotídeos intitulada sequência GATA (EPPLEN et al., 1982). Essa classe de DNA satélite além de estar relacionada frequentemente a presença de cromossomos sexuais heteromórficos, principalmente em répteis, apresenta-se conservada em várias espécies, incluindo a humana (SRIVASTAVA et al., 2008). De acordo com Wichman et al. (1991), DNAs satélites possuem a competência de divergir durante a evolução, se tornando valiosa para a resolução de adversidades de ordem taxonômica e evolutiva entre conjuntos de indivíduos relacionados.

Desta forma, o presente projeto tem como objetivo realizar a detecção cromossômica do microssatélite (GATA)<sub>n</sub> em espécies/população cultivadas e naturais do complexo *Astyanax bimaculatus* coletados na região de influência do Lago de Itaipú.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* (Figura 1) foram coletados com auxílio de redes e/ou tarrafas e peneiras em tributários do Lago de Itaipú e em pisciculturas da região de Santa Helena – PR (Tabela 1) - Licença permanente SISBIO 38532-3. Tais exemplares coletados foram levados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Santa Helena, e mantidos em aquários aerados. Posteriormente, os espécimes foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000; PEREIRA-DA-SILVA, 2009), para a obtenção dos tecidos para as preparações cromossômicas.

Figura 1 – Exemplar fêmea de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*.



Fonte: Autoria própria (2019).

O presente trabalho faz parte de um projeto universal, intitulado “Caracterização citogenética e do DNA mitocondrial em espécies de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* (Characiformes, Characidae) de pisciculturas da região do Lago de Itaipu e seus impactos sobre a espécie nativa *A. altiparanae*.”, que possui autorização de execução do Comitê de Ética no Uso de Animais da UTFPR - Protocolo CEUA: 2018-5.

Tabela 1 - Pontos de coleta de *Astyanax bimaculatus* (M-macho; F-fêmea).

Localidade	Indiv. analisados	Coord. geográficas	Elevação
Piscicultura Santa Helena	2 M e 2 F	24°52'41.55"S 54°19'53.53"O	248m
Piscicultura Cerâmica	2 M e 2 F	24°54'36.82"S 54°19'12.07"O	235m
Córrego São Gabriel	2 M e 2 F	24°56'47.00"S 54°19'00.00"O	242m
Córrego Sanepar	2 M e 2 F	24°51'53.65"S 54°19'47.56"O	275m
Córrego Sub Sede	2 M e 2 F	24°47'01.55"S 54°18'45.07"O	232m
Córrego Esquina Céu Azul	2 M e 2 F	24°54'47.91"S 54°17'35.82"O	247m

Fonte: Autoria própria (2019).

Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Foresti et al. (1993). A sequência (GATA)<sub>n</sub> foi mapeada nos cromossomos usando hibridização in situ fluorescente (FISH) de acordo com Pinkel et al. (1986), com modificações na etapa de desnaturação. A sonda (GATA)<sub>n</sub> foi obtida e marcada via PCR com os primers (GATA)<sub>7</sub> e (TATC)<sub>7</sub> (Ijdo et al., 1991). A hibridização foi realizada de 12 a 14 horas (overnight), a 37° C. A solução de hibridização consistiu de 6 µL da sonda; 6 µL de 20xSSC; 30 µL de formamida 50% e 12 µL de sulfato dextrano (10%), por lâmina. O sinal de detecção utilizado foi antidigoxigenina-rodamina. A hibridização foi realizada sob condições de alta severidade (77%). As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão no microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX53 com câmera digital QColor5M acoplada. As lâminas de FISH foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência, sob filtro apropriado.

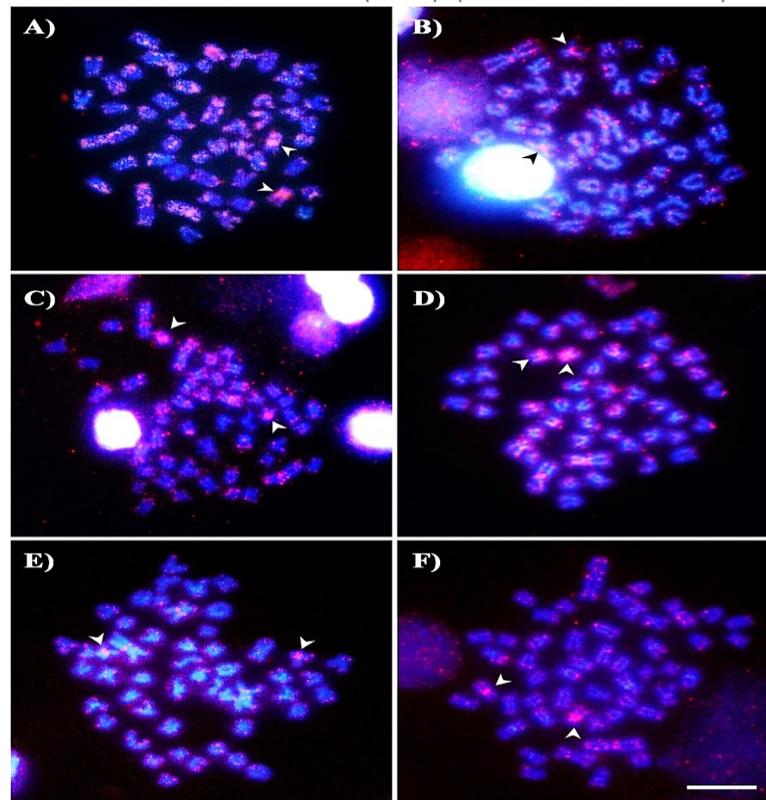
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FISH com sonda (GATA)<sub>n</sub> revelou a presença deste elemento repetitivo disperso pelos cromossomos de todas as populações analisadas. Foi encontrado pelo menos um par de cromossomos metacêntricos marcados na porção pericentromérica em todas as populações (Figura 2 - Setas). É possível notar também que a sonda produziu sinais bem dispersos e mais fracos por quase todos os cromossomos nas populações, porém existem pares que parecem não apresentar marcações.

O mapeamento físico da sequência (GATA)<sub>n</sub> por meio de FISH tem sido raramente utilizado em peixes (MERLO et al. 2007). Segundo a literatura, é possível encontrá-la de forma dispersa por vários cromossomos em algumas espécies, como o presente estudo, em *Amphichthys cryptocentrus* Valenciennes, 1837,

*Thalassophryne maculosa* Gunther, 1861, *Porichthys plectrodon* Jordan & Gilbert, 1882, *Batrachoides manglae* Cervigón, 1964, (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010).

Figura 2 – Metáfases de *Astyanax bimaculatus* de diferentes localidades, sendo: A) Piscicultura Santa Helena, B) Córrego São Gabriel, C) Piscicultura Cerâmica, D) Córrego Sanepar, E) Córrego Sub Sede e F) Córrego Esquina Céu Azul, submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda (GATA)<sub>n</sub> (evidenciada na cor rosa).



Fonte: Autoria própria (2019).

Em estudos realizados com espécies de *Astyanax* por Piscor et al (2016), puderam ser encontradas marcações de (GATA)<sub>n</sub> co-localizadas com rDNA 5S em *A. altiparanae*, *A. marionae*, *A. fasciatus*, e *A. schubarti*. Os resultados encontrados por esses autores indicam que a sequência (GATA)<sub>n</sub> pode atuar como bom marcador cromossômico em algumas espécies sul-americanas de *Astyanax*.

No presente estudo, as populações Piscicultura Santa Helena, Piscicultura Cerâmica e Córrego Sanepar exibiram maior dispersão da sonda (GATA)<sub>n</sub>, com maiores acúmulos dessa sonda pelos cromossomos do complemento, diferente das demais populações que apresentaram marcações mais fracas e em menor quantidade de pares de cromossomos. É pertinente ressaltar que, como descrito anteriormente, em todas as populações analisadas há a presença de um cromossomo metacêntrico médio com acúmulo da sequência (GATA)<sub>n</sub> na posição pericentromérica (Figura 2 – Setas). Estes cromossomos são claramente correspondentes ou homeólogos, evidenciando que o acúmulo desta sequência na referida região deu-se anteriormente à diferenciação das populações/espécies analisadas.

A ausência do microssatélite (GATA)<sub>n</sub> em alguns cromossomos das populações analisadas no presente trabalho podem ser explicadas pela ausência da sequência nestes cromossomos ou pelo fato desta sequência estar em tão baixa concentração naqueles cromossomos que a sensibilidade da FISH, para a estringência utilizada (77%), não foi suficiente para captar sua presença.

## CONCLUSÃO

Esse estudo corrobora com dados de citogenética molecular para o grupo *A. bimaculatus*, apresentando contribuições sobre a localização e dispersão da sequência (GATA)<sub>n</sub> em populações do complexo *A. bimaculatus*. Adicionalmente, pelo fato de outros autores terem encontrado a sequência de microssatélite (GATA)<sub>n</sub> com distribuição diferente da encontrada por nós para as populações analisadas no presente trabalho, podemos inferir que esta sequência é um excelente marcador cromossômico em *Astyanax*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento, à UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) Câmpus Santa Helena, ao Grupo de Estudos em Ictiologia Neotropical (GEIN), ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a Polícia Ambiental de Santa Helena.

## REFERÊNCIAS

EPPLEN, J. T.; MC CARREY, J. R.; SUTOU, S.; OHNO, S. Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79:3798-3802. 1982.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using “*in vitro*” short treatment with colchicine. *Experientia*. 49: 810-813. 1993.

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57: 1453–1464. 2000.

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Research*. 19:4780. 1991.

MERLO A, CROSS I, PALAZÓN JL, SARASQUETE C, REBORDINOS L: Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> by one-color and double color FISH in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). *Genetica*. 131: 195–200. 2007.

MIRANDE, J.M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8:385-568. 2010.

OLIVEIRA, C., AVELINO, G.S., Abe, K.T., MARIGUELA, T.C., BENINE, R.C., ORTÍ, G., et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology*, doi: 10.1186/1471-2148-11-275. 2011.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M., OLIVEIRA, R. H. F., RIBEIRO, M. A. R., COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural, Santa Maria* 39(6): 1851-1856. 2009.

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

PISCOR, D., & PARISE-MALTEMPI, P. P. Microsatellite Organization in the B Chromosome and A Chromosome Complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species. *Cytogenetic and Genome Research*, 148(1), 44–51. doi:10.1159/000444728. 2016.

SRIVASTAVA, J.; PREMI, S.; KUMAR, S.; ALI, S. Organization and differential expression. Of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoa transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. *BMC Genomics*. 9(132):1-17. 2008.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*. 138:787-794. 2010.

WICHMAN, H. A.; PAYNE, C. T.; RYDER, O. A.; HAMILTON, M. J.; MALTBIE, M.; BAKER, R. J. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *Journal of Heredity*. 82:369-377. 1991.