



## Introgressão entre diferentes linhagens de anuros evidenciada por polimorfismo de NORs

**Palavras-Chave:** cromossomo, *Physalaemus*, Híbridação *in situ* Fluorescente.

**Autores:**

**Helena Mattiazzo Milanez, IB – UNICAMP**

**Lucas Henrique Bonfim Souza, IB - UNICAMP**

**Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço (orientadora), IB - UNICAMP**

---

### INTRODUÇÃO:

O complexo de espécies *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ephippifer*, pertencente à família Leptodactylidae (Anura), apresenta interessante diversidade críptica de espécies (Nascimento et al., 2019). Recentemente, análises filogenéticas promovidas por Nascimento e colaboradores (2019) corroboraram o reconhecimento de pelo menos três linhagens de evolução independente nesse grupo, denominadas Linhagens 1-3 de “*P. cuvieri*”. Além disso, nas mesmas análises, o parafiletismo de *P. cuvieri* em relação a *P. ephippifer* e *Physalaemus* sp. (clado composto por uma ou duas espécies ainda não descritas) foi sustentado. Na hipótese filogenética apresentada pelos autores (Figura 1), *P. ephippifer* é o clado irmão da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” (L1). O clado composto por estes terminais, por sua vez, é irmão de *Physalaemus* sp., enquanto a Linhagem 2 de “*P. cuvieri*” (L2) é irmã do clado formado por *Physalaemus* sp., *P. ephippifer* e L1. Finalmente, a Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” (L3) têm como grupo irmão o clado formado pelas demais linhagens do complexo de espécies (Figura 1).

Assinaturas cariotípicas relativas a uma gama de marcadores cromossômicos são notáveis ao longo das distintas linhagens (Quinderé et al., 2009; Nascimento et al., 2010, 2019; Vittorazzi et al., 2011, 2014; Gatto et al., 2021; Souza et al., in prep). *Physalaemus ephippifer* e os exemplares de São Pedro de Água Branca-MA, Vila Nova dos Martírios-MA, Trecho Seco-MA e Imperatriz-MA (denominada região de SPAB-VNM-TS/Imp) apresentam cromossomos sexuais heteromórficos Z e W (Nascimento et al., 2010; Souza et al., in prep), característica ausente nas demais linhagens do complexo de espécies (Quinderé et al., 2009). Além disso, variações referentes ao número e distribuição de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), bandas de heterocromatina constitutiva (bandas C) e *clusters* de DNAs repetitivos são evidentes nas linhagens em questão (Quinderé et al., 2009; Nascimento et al., 2010, 2019; Vittorazzi et al., 2011, 2014; Gatto et al., 2021; Souza et al., in prep). Dentre as sequências repetitivas que têm se mostrado relevantes para o grupo em estudo, destacam-se as NORs (Quinderé et al., 2009; Nascimento et al., 2019), o gene transcritor de snRNA U2 (Souza et al., in prep) e a

sequência repetitiva denominada Pep-CL02 - recentemente identificada e em atual caracterização (Souza et al., in prep).

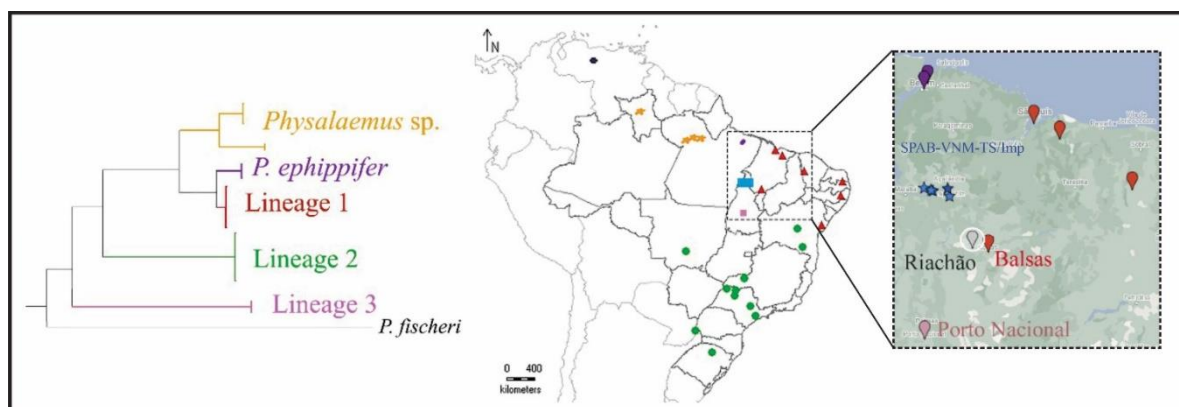
Em L1, NORs estão presentes em 8q e 9q (Quinderé et al., 2009) e bandas C não centroméricas são observadas em regiões intersticiais de 5p, 8q e 9q e na região pericentromérica de 9p (Quinderé et al., 2009). No cromossomo 8, a NOR é flanqueada por bandas C, ao passo que no cromossomo 9, as NORs coincidem com bandas C (Quinderé et al., 2009). Ainda, *clusters* do gene para snRNA U2 e do Pep-CL02 são mapeados, respectivamente, nas regiões terminal de 6p e pericentromérica de 9p (Souza et al., in prep.).

A L3, por sua vez, é notável por apresentar alto polimorfismo relativo ao número e distribuição de NORs - sendo algumas coincidentes com blocos heterocromáticos evidenciados por bandamento C (Quinderé et al., 2009). Bandas C não centroméricas se distribuem em regiões intersticial de 5p, pericentromérica de 7p e telomérica do par 1 (Quinderé et al., 2009). A sequência do gene para snRNA U2 é, também, polimórfica em relação à sua distribuição: sinais desse marcador já foram encontrados nos pares cromossômicos 1, 6 e 9 (Souza et al., in prep.). Finalmente, *clusters* de Pep-CL02 são mapeados em região intersticial de 6q e, em condição polimórfica, em 9p e 9q (Souza et al., in prep.).

Finalmente, em *P. ehippifer*, as NORs são detectadas apenas nos cromossomos sexuais Z e W e estão dispostas na região terminal de Zq e Wq e adjacente a um bloco heterocromático terminal de Wp (Nascimento et al., 2010). Bandas C não centroméricas se localizam na região terminal de Wp, intersticial de Wq, Zq, 2p e 5p e na região pericentromérica de 3p, 7p, 9p, Wq e Zq, além de 1q (Nascimento et al., 2010). *Clusters* de Pep-CL02 são mapeados na região intersticial de Zq e pericentromérica de Zq e Wq, enquanto *clusters* do gene transcritor de snRNA U2 são encontrados na região terminal de 6p e Zp e, em condição polimórfica, na região pericentromérica de 6q (Souza et al., in prep.).

As linhagens do complexo *P. cuvieri* – *P. ehippifer* possuem distribuição geográfica não sobreposta (Lourenço et al., 2015; Nascimento et al., 2019) (Figura 1). Entretanto, zonas de contato secundário entre distintas linhagens foram identificadas a partir da análise conjunta de marcadores citogenéticos, sequências de DNA mitocondrial e marcadores 3RAD (Tenório, 2020; Souza et al., in prep.). No município de Balsas-MA foram encontradas evidências de introgressão entre L1 e L3, enquanto a análise da região de SPAB-VNM-TS/Imp sugere hibridação histórica entre L1 e *P. ehippifer* (Tenório, 2020; Souza et al., in prep.). Vale ressaltar que os exemplares de SPAB-VNM-TS/Imp possuem, como assinatura citogenética exclusiva, a presença de NOR no cromossomo 7 (Tenório, 2020; Souza et al., in prep.). Além disso, nessa população, o cromossomo W, homeólogo ao cromossomo W de *P. ehippifer* e ao cromossomo 9 de L1, apresenta, no braço curto, *clusters* de Pep-CL02 pericentroméricos e NOR distal – o que o assemelha ao cromossomo W de *P. ehippifer* e o difere do cromossomo 9 de L1. Entretanto, diferentemente de *P. ehippifer*, não há banda C terminal em Wp nessa população. O braço longo do cromossomo W da população de SPAB-VNM-TS/Imp, por sua vez, apresenta NORs coincidentes com bandas C e não possui *clusters* de Pep-CL02, o que o assemelha ao cromossomo 9 de L1.

A extensão do contato secundário entre as linhagens segue em estudo e tem suma importância para o entendimento da taxonomia e dinâmica evolutiva nesse grupo de anuros. O município de Riachão-MA é uma área de grande interesse para investigação, já que está localizado próximo a Balsas e SPAB-VNM-TS/Imp (Figura 1). Neste contexto, no presente estudo, considerando a relevância dos marcadores citogenéticos na comparação das linhagens e identificação de zonas de contato, caracterizamos citogeneticamente exemplares provenientes de Riachão.



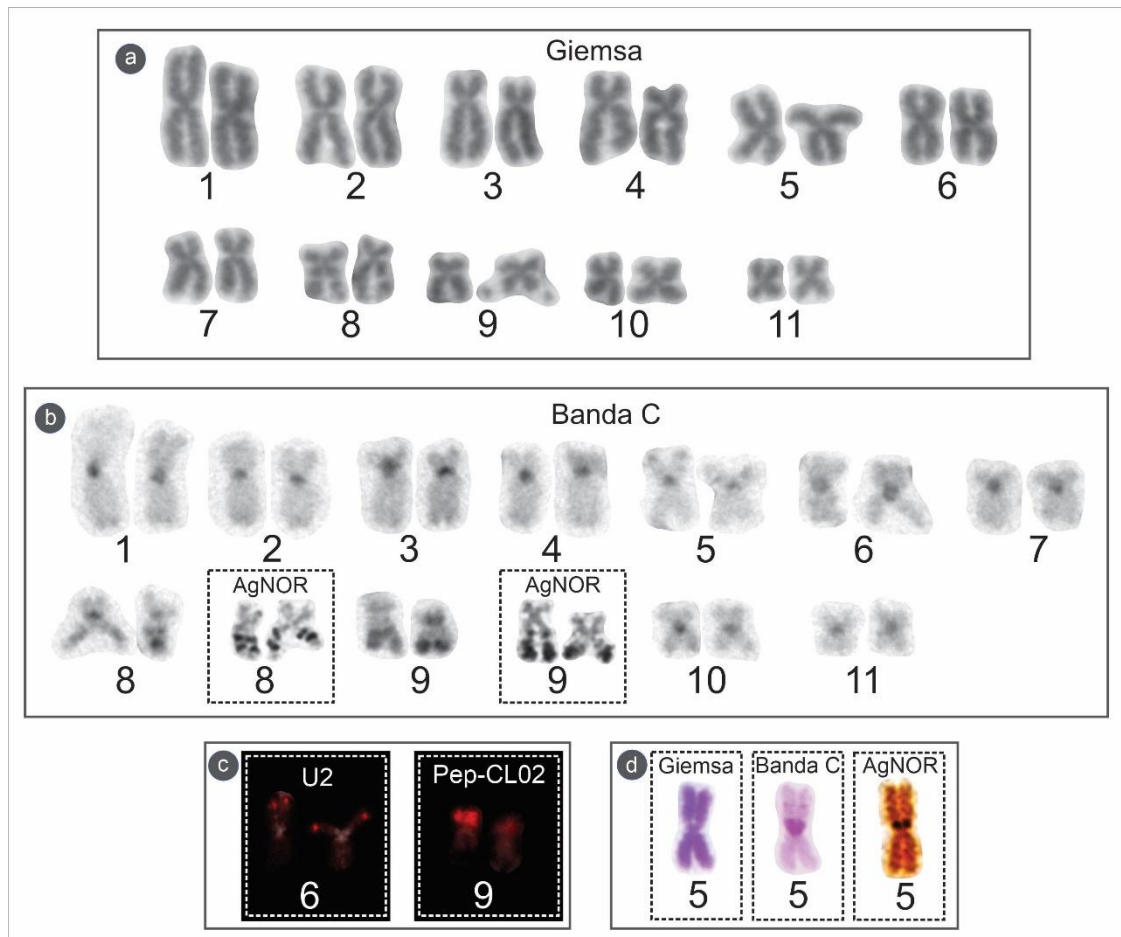
**Figura 1.** Distribuição geográfica das linhagens do complexo de espécies *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ephippifer* e suas relações filogenéticas, inferidas a partir de sequências de DNA mitocondrial. As diferentes linhagens estão representadas por cores específicas, correspondentes nos mapas e no cladograma. O mapa à direita evidencia, em cinza, a localização geográfica de Riachão, sítio de interesse do presente projeto. O cladograma mostrado foi baseado em Nascimento et al. (2019).

## METODOLOGIA:

Foram analisadas preparações cromossômicas de sete machos e duas fêmeas de *Physalaemus* sp. de Riachão, as quais estão armazenadas no banco citogenético “Shirlei Maria Recco Pimentel” (SMRP), no Laboratório de Estudos Cromossômicos (LabEsC), no Instituto de Biologia da UNICAMP. As preparações foram previamente obtidas de acordo com protocolo desenvolvido por King e Rofe (1976), com as modificações sugeridas por Gatto et al. (2018). A descrição cariotípica da população foi promovida a partir de métodos da citogenética clássica e citogenômica. Primeiramente, foram promovidas a coloração com Giemsa, a impregnação por prata (Howell & Black, 1980) e o bandamento C (Sumner, 1972). Posteriormente, foram mapeados, por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) os DNAs repetitivos Pep-CL02 e o gene transcritor de snRNA U2. As sondas para o gene transcritor de U2 e para o Pep-CL02 foram marcadas com digoxigenina em reações de PCR com, respectivamente, os *primers* U2-F (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTTG-3') e U2-R (5'- TCCTGGAGGTACTGCAATA-3') (Souza et al., in prep.) e Pcp4fCl02-F (5'-GAGTTCGAATGCCCATCG- 3') e Pcp4fCl02-R (5'-GCAAGGCATATAGAGCAAGCT-3') (Souza et al., in prep.). A hibridação das sondas seguiu o protocolo de Viegas-Péquignot (1992), sendo a detecção feita com anti-digoxigenina conjugada com rodamina (0,06 µg/mL; Roche). As preparações cromossômicas foram contracoradas com DAPI (0,5 µg/mL).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Todos os indivíduos analisados apresentam número diploide de 22 cromossomos, com seis pares metacêntricos (pares 1, 2, 5, 6, 10 e 11) e cinco pares submetacêntricos (pares 3, 4, 7, 8 e 9). Bandas de heterocromatina constitutiva são observadas na região peri/centromérica de todos os cromossomos, na região intersticial de 5p, 8q e 9q e terminal de 9q (Figura 2b). Vale ressaltar que a banda C pericentromérica do par 9 é fortemente evidenciada. Ademais, NORs estão presentes em 8q e 9q (Figura 2b). Uma das fêmeas apresenta uma NOR adicional no braço curto de um dos homólogos do par 5, coincidente com constrição secundária e banda C (Figura 2d). Com relação ao mapeamento dos DNAs repetitivos, sinais dos *clusters* do gene para snRNA U2 e do Pep-CL02 são mapeados, respectivamente, na região terminal de 6p e na região pericentromérica de 9p (Figura 2c).



**Figura 2.** Cariótipo de exemplares de *Physalaemus* sp. de Riachão submetido a diferentes técnicas - coloração com Giemsa (a), bandamento C (b), impregnação por prata (*insets* em b) e Híbridação *in situ* Fluorescente (c). Em c, destacam-se os cromossomos que apresentaram *clusters* do gene para snRNA U2 (à esquerda) e do DNA repetitivo Pep-CL02 (à direita). Em d, o cromossomo 5 portador de NOR, característico de um dos indivíduos analisados. Nota-se a posição pericentromérica da NOR e sua coincidência com uma constrição secundária e uma banda C.

Os cariótipos analisados possuem grande semelhança com aquele característico de L1, com destaque para a presença de NORs em 8q e 9q, bandas C em 5p, 8q, 9p e 9q, e *clusters* de Pep-CL02 e do gene para snRNA U2 em 9p e 6p, respectivamente. Entretanto, a NOR presente em um dos homólogos do par 5 de um dos indivíduos é uma característica ausente em L1 e já encontrada em exemplares de L3 (Quinderé et al., 2009). Ademais, a ausência de NORs no par 7 e de heteromorfismo relacionado ao sexo no par 9 difere esses cariótipos daquele característico da região de SPAB-VNM-TS/Imp.

Como apontado anteriormente, a partir de dados citogenéticos, de DNA mitocondrial e de bibliotecas 3RAD, a introgressão de L3 em L1 foi inferida em estudos prévios que incluíram exemplares de Balsas. Os espécimes dessa localidade apresentaram NORs nos pares 8 e 9, padrão característico de L1. Adicionalmente, dois indivíduos apresentaram NORs nos pares 7 e 10 – condição ausente em L1 e já encontrada em espécimes de L3. Os últimos foram, então, interpretados como introgridos de L3 em L1. Considerando os resultados do presente projeto, é evidente que um cenário semelhante a esse se estabelece em Riachão. Portanto, hipotetiza-se que o cromossomo 5 portador de NOR característico de um dos indivíduos analisados desse município seja, também, resultante da introgressão de L3 em L1.

## CONCLUSÕES:

Os dados referentes à análise citogenética dos indivíduos de Riachão demonstram o predomínio de cariótipos idênticos ao característico de L1. A presença de uma NOR adicional no par 5 em um dos indivíduos sugere, entretanto, que esse município possa fazer parte da zona de introgressão entre L3 e L1, com grande influência de L1. Futuras análises de marcadores 3RAD e de seqüências de DNA mitocondrial poderão contribuir para a análise dessa hipótese.

## BIBLIOGRAFIA:

- Gatto, K.P.; Souza, L.H.B., Nascimento, J.; Suárez, P.; Lourenço, L.B. Comparative mapping of a new repetitive DNA sequence and chromosome region-specific probes unveiling rearrangements in an Amazonian frog complex. **Genome**. v.64, n.9, p.857-868, 2021. DOI: 10.1139/gen-2020-0199.
- Howell, W.M.; Black, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**. v.36, n.8, p.1014–1015, 1980. DOI: 10.1007/BF01953855.
- Lourenço, L.B.; Targueta, C.P.; Baldo, D.; Nascimento, J.; Garcia, P.C.A.; Andrade, G.V.; Haddad, C.F.B.; Recco-Pimentel, S.M. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.92, p.204–216, 2015. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.06.011.
- Nascimento, J.; Quinderé, Y.R.S.D.; Recco-Pimentel, S.M.; Lima, J.R.F.; Lourenço, L.B. Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ehippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). **Genetica**. v.138, n.11-12, p.1127-1132, 2010. DOI: 10.1007/s10709-010-9501-9.
- Nascimento, J.; Lima, J.D.; Suárez, P.; Baldo, D.; Andrade, G.V.; Pierson, T.W.; Fitzpatrick, B.M.; Haddad, C.F.B.; Recco-Pimentel, S.M.; Lourenço, L.B. Extensive Cryptic Diversity Within the *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ehippifer* Species Complex (Amphibia, Anura) Revealed by Cytogenetic, Mitochondrial, and Genomic Markers. **Frontiers in Genetics**. v.10, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00719.
- Quinderé, Y.R.S.D.; Lourenço, L.B.; Andrade, G.V.; Tomatis, C.; Baldo, D.; Recco-Pimentel, S.M. Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. **Biological Research**. v.42, n.1, p.79-92., 2009. DOI: 10.4067/S0716-97602009000100008.
- Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v.75, p.304-306, 1972. DOI: 10.1016/0014-4827(72)90558-7.
- Tenório, R. **Análise genética e citogenética do complexo *Physalaemus cuvieri* - *Physalaemus ehippifer* (Anura, Leptodactylidae)**. 65 f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2020.
- Viegas-Péquignot, E. In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (Ed.): In Situ Hybridization: A Practical Approach. Oxford University Press, IRL Press, Oxford. p.137–158, 1992.
- Vitorazzi, S.E.; Lourenço, L.B.; Del-Grande, M.I.; Recco-Pimentel, S.M. Satellite DNA Derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v.134, n.2, p.101-107, 2011. DOI: 10.1159/000325540.
- Vitorazzi, S.E.; Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**. v.15, 2014. DOI: 10.1186/s12863-014-0111-x.