

ANÁLISE GENÉTICA DE *Microsternarchus* (Gymnotiformes, Hypopomidae) ATRAVÉS DE DNA *barcoding* E MARCADORES CITOGENÉTICOS

Vanessa Susan da Silva PINHEIRO¹; Maelin SILVA²; José Antônio Alves GOMES³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Coorientador INPA/GCBEv; ³Orientador CBIO/INPA

1. Introdução

Os representantes da ordem Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi) são conhecidos popularmente como peixes-elétricos, por terem a capacidade de gerar corrente elétrica a partir do Sistema Eletrogênico Eletrosensório (SEE) (Alves-Gomes *et al.* 1995). Atualmente existem divergências quanto ao número de famílias podendo ser classificadas em cinco (Albert e Campos-da-Paz, 1998; Albert, 2001), seis (Mago-Leccia, 1976) ou sete famílias (Alves-Gomes *et al.*, 1995), contudo são considerados um grupo monofilético.

Embora muitos trabalhos de evolução e reconhecimento biológico com Gymnotiformes baseados em anatomia, fisiologia, DOE (descarga do órgão elétrico) e marcadores moleculares venham sendo desenvolvidos com este grupo, estudos citogenéticos ainda são escassos. Tais estudos podem auxiliar a responder ou dar embasamento para formulação de hipóteses a respeito da evolução da ordem. Marcadores cromossômicos como fórmula cariotípica, regiões heterocromáticas, localização de regiões organizadoras de nucléolos e mais recentemente a hibridização *in situ* (FISH), têm se mostrado eficientes no auxílio de estudos taxonômicos e sistemáticos da ictiofauna amazônica, assim como em outras bacias hidrográficas brasileiras (Feldberg *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 2001; Silva e Margarido, 2005).

Dentre os Gymnotiformes, a família Hypopomidae tem chamado a atenção para estudos evolutivos. A tribo Microsternarchini é composta por dois gêneros monotípicos (*Microsternarchus* e *Racenisia*), sendo as suas únicas espécies descritas denominadas de *Microsternarchus bilineatus* e *Racenisia fimbriipinna*. Ainda que *Microsternarchus* seja descrito como um gênero monotípico, variações em sua morfologia externa e em características da DOE têm sido observadas. Além disso, resultados preliminares de Maia, (2011) baseados em variações das sequências nucleotídicas da região controle do DNAm, CO-I (Citocromo Oxidase 1) e o gene nuclear Rag-1 (Gene de Ativação da Região-1) demonstram a separação de *Microsternarchus* em cinco linhagens distintas (A, B, C, D e E), com valores elevados de divergência genética, de vários tributários do Rio Negro, sugerindo a existência de unidades evolutivas divergentes.

Diante disso este trabalho teve como objetivo analisar o gênero *Microsternarchus* em tributários ao longo do baixo e médio Rio Negro pra verificar a associação de diferenças na macroestrutura cariotípica das linhagens reconhecidas pelo código de barra.

2. Material e Métodos

Foram coletados 31 espécimes de *Microsternarchus* (6 machos, 6 fêmeas e 19 de sexos não identificados) em igarapés (Ilg. Quimicuri, Ilg. Branco, Ilg. Baruri, Ilg. Aduiá, Ilg. Zamula, Ilg. LaiXua, Ilg. Jabuti, Ilg. Mato grosso, Ilg. Tarumã Grande) ao longo do baixo e médio Rio Negro durante os meses de Novembro/2011 e Junho/2012.

Para identificação das linhagens foram realizadas análises moleculares baseadas no gene mitocondrial CO-I. Para isso o DNA total dos indivíduos foi extraído segundo o protocolo básico de Sambrook (1989), a sequência alvo foi amplificada via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os *primers* BOL-COlfishF1 (5'TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3') e BOL-COlfishR1 (5'ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA 3') (Ward *et al.*, 2005), a purificação dos produtos da PCR foi realizada utilizando Polietilenoglicol (PEG) 20% e as sequências foram obtidas a partir de sequenciamento de DNA em ciclos pelo método Sanger *et al.* (1977) e leitura no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (*Applied Biosystems*). Os produtos da extração de DNA, da PCR e da purificação foram verificados e quantificados por comparação com marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose corado com Gel Red (Biotium). As sequências de DNA obtidas foram, então, alinhadas e consequentemente manualmente editadas no software BIOEDIT 6.0.7 (Hall, 1999). Logo após foram compiladas e conferidas uma a uma para confirmação das mutações observadas utilizando o mesmo *software*. As sequências foram posteriormente alinhadas com sequências das linhagens A, B, C, D e E de Maia (2011). A verificação do sinal filogenético foi realizada a partir da análise do gráfico de saturação gerado no *software* Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011). As sequências foram agrupadas em uma árvore filogenética utilizando a análise de *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou e Nei, 1987) tendo como modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) de acordo com o protocolo estabelecido pelo DNA *barcoding*. Tais análises foram realizadas no *software* Mega 5.

Para as análises citogenéticas foram obtidos cromossomos mitóticos de acordo com Bertollo *et al.* (1978). As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico com lâminas previamente preparadas (lavadas, secas ao ar e imersas em água destilada a 60°C). As lâminas a 60°C

e com uma película de água foram submetidas a gotejamento das preparações, posteriormente coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0.06M e pH 6,8 por 15 minutos e lavadas com água destilada. O bandejamento cromossômico (Banda C) foi realizado de acordo com Sumner (1972) e a detecção de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NOR) segundo Howel e Black (1980). A hibridação fluorescente *in situ* será utilizada para mapear o DNAr 5S, seguindo o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986). As sondas de DNAr 5S foram obtidas através de PCR utilizando os primers 5'-TACGCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3' isolados da truta arco-íris (Komiya e Takemura 1979; Martins e Galetti Jr., 1999). As preparações mitóticas foram analisadas em microscópio óptico e/ou fotomicroscópio de epifluorescência Olympus Bx-51 as melhores foram fotografadas para montagem de cariótipo no programa *AdobeImageReady* CS. Os cromossomos metafásicos foram recortados, emparelhados, medidos e colocados em ordem decrescente de tamanho. A relação de braços dos cromossomos foi determinada de acordo com Levan *et al.* (1964).

3. Resultados e Discussão

A identificação das linhagens foi feita com base no gene mitocondrial CO-I, a partir de 29 sequências de DNA de *Microsternarchus* que resultaram no alinhamento de 678 pares de base (pb). Não foram encontrados códons de parada nem *indels* (inserções e deleções).

Comparações entre as médias das frequências de cada base nitrogenada foram realizadas e o resultado obtido foi: A=24.3%, G=17.6%, C=29.9%, T=28.2%. As médias das frequências obtidas são similares às obtidas por Maia (2011) para o gênero *Microsternarchus* e por Schmitt (2005) para *Rhamphichthyidae* e *Hypopomidae*. O gráfico de saturação calculado a partir do número total de transições e transversões em função da divergência genética entre as sequências (distância K2P não corrigida) mostrou uma alta taxa de preservação do sinal filogenético, tendo em vista que as sequências nucleotídicas não atingiram a saturação de substituição.

A topologia obtida por NJ utilizando as 29 sequências de DNA obtidas somadas as 31 sequências obtidas por Maia (2011) mostrou a separação em cinco linhagens distintas (A, B, C, D, E) suportadas por um alto valor de *bootstrap*. As sequências obtidas neste trabalho pertencem às linhagens B (três indivíduos), C (seis indivíduos) e D (vinte indivíduos).

O número diploide determinado para a linhagem B foi 48 cromossomos, com fórmula cariotípica 16m-sm+32a (♂) e 17m-sm+31a (♀); número fundamental de 64 (♂) e 65 (♀). Na fêmea foi possível observar dois cromossomos (um acrocêntrico e um metacêntrico) que não se emparelharam, em contrapartida a um par acrocêntrico no macho, sugerindo a existência de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. O padrão de banda-C foi centromérico contendo marcações adicionais nas regiões proximais em um dos autossomos dos pares 3, 8 e 5. A RON foi múltipla envolvendo quatro pares. Nos pares 3, 6 e 21, as marcações estão na região terminal dos braços longos sendo que somente um dos homólogos foi marcado pela prata. Para o par 4 a marcação foi evidenciada na região terminal do braço curto em ambos os homólogos. A marcação em apenas um dos homólogos pela técnica Ag-RON está relacionada com a capacidade da impregnação da prata ocorrer apenas em proteínas ácidas que se associam ao RNAr. Logo, caso regiões organizadoras de nucléolo não estejam em atividade de transcrição tais regiões não são evidenciadas pela técnica (Kasahara 2009) (Figura 1).

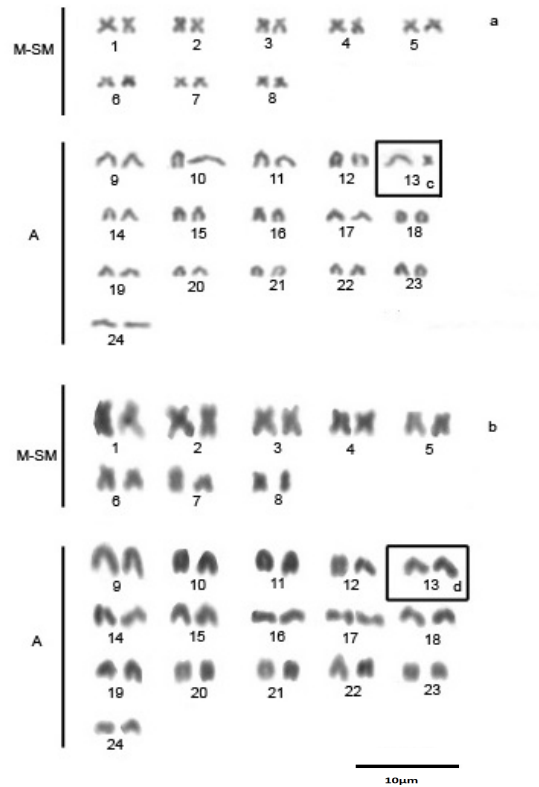


Figura 1. Cariótipos de *Microsternarchus* da linhagem B: fêmea (a) e macho (b) em coloração convencional. Em evidência os prováveis cromossomos sexuais da fêmea (um acrocêntrico e um metacêntrico) (c), em contrapartida a um par acrocêntrico no macho (d), sugerindo a existência de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

A marcação do DNAr 5S mostrou-se em um par. Este gene ribossomal é responsável por produzir proteínas que juntamente com os RNAr 28S e 5,8S formarão a subunidade maior dos ribossomos. A utilização desse marcador para a Ordem tem se mostrado eficiente pela variação encontrada dentro do grupo. Scacchetti *et al.* (2011), por exemplo, encontrou na família Gymnotidae marcação em um par para *Gymnotus sylvius* e em três pares para *Gymnotus inaequilabatus*, e Silva *et al.*, (2011) encontrou dois pares em *G. pantanal* e dezoito pares para *G. paraguensis*, sugerindo que este gene possa ser um marcador citotaxonomico para o gênero.

Os dados obtidos neste trabalho diferem dos dados encontrados por Moraes *et al.* (2008) para *Microsternarchus bilineatus* provindos de tributários da região de Novo Airão (AM), Baixo Rio Negro. Os indivíduos analisados por Moraes *et al.* (2008) também apresentaram diferença no número diploide e fórmula cariotípica entre machos e fêmeas sendo que as fêmeas têm $2n=48$ cromossomos (16m-sm+32a) e os machos $2n=47$ (17m-sm+30a). Os autores sugeriram a presença de cromossomos sexuais do tipo múltiplo $X1X1X2X2/X1X2Y$. O padrão de Banda C foram blocos centroméricos e a RON simples. Portanto, isso indica tratar-se de uma outra linhagem (Figura 2).

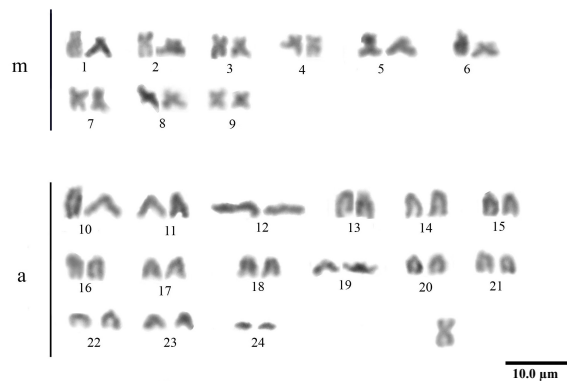


Figura 2. Cariótipo de um macho de *Microsternarchus* da linhagem C em coloração convencional.

4. Conclusão

Corroborando dados moleculares prévios de Maia (2011), a macroestrutura cariotípica ($2n$, NF e Fórmula Cariotípica) das Linhagens B e C já se diferenciam inclusive nos mecanismos de cromossomos sexuais.

Tais constituições cariotípicas distintas tem efeito pré-zigótico tornando as linhagens estudadas espécies-irmãs, quando os cariótipos são incompatíveis para serem de uma mesma espécie.

5.Referências Bibliográficas

- Albert, J. S.; Campos-da-Paz, R. 1998 Phylogenetic systematics of America knifefishes: a review of the available data. 419-446. In: Malabarba L, Reis R E, Vari R P, de Lucena C A S, de Lucena Z M S (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS.
- Albert, J.S. (2001). Species diversity and phylogenetical systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). *Miscellaneous Publications*, Museum of Zoology, University of Michigan, 190, 1-129.
- Alves-Gomes, J. A.; Orti, G.; Haygood, M.; Heiligenberg, W.; Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the south american electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis base on morphology, electrophysiology and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 12(2). 298-318 p.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1/2: 103-120, 1978Feldberg *et al.*, 1992
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. (2003). Chromosomal Changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (2003). *Fish Adaptation*. IBH & Oxford, New Dehli & New York. p.287-310.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Howell, W.M.; Black, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with the protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015, 1980.
- Kasahara, 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. Brazil
- Kimura, M. 1980 . A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Komiya, H.; Takemura, S. 1979. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*, 86: 1067-1080.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220
- Maia, C.R. 2011. Diferenciação genética e relações filogenéticas entre as linhagens de *Microsternarchus* (Gymnotiformes: Hypopomidae) na bacia do rio Negro, em função de marcadores moleculares mitocondriais. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 81p.
- Mago-Leccia, F. (1976). *Venezuelan gymnotiform fishes: a preliminary study for a revision of the*
- Martins, C.; Galetti, Jr P. M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anodtomidae, Characiformes). *Chrom. Res.* 7: 363-367
- Morais, B. N. G.; Feldberg, E.; Gross, M.C.; Schmitt, R. *Microsternarchus bilineatus*: caracterização citogenética de um gênero monotípico da família Hypopomidae (Gymnotiformes). Resumo de PIBIC, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.
- Nakayama, C.M.; Jégu, M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. (2001). Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia* 2001(3): 866-869.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescent hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83: 2934-2938, 1986
- Saitou, N.; Nei, M. 1987 The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Evol.* 4:406-425.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Sanger *et al.* (1977)
- Schmitt, R. 2005. *Filogeografia de Hypopygus lepturus Hoedeman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia*. Dissertação de Mestrado – INPA/UFAM, Manaus, Brasil. 131pp.
- Silva, E.B.; Margarido, V.P. (2005). An X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73, 293-297.
- Silva, M. ; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Margarido, V.P. 2011 Physical mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes) Cytogenetic and Genome Research.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 74: 304-306.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1847-1857