

ESTUDO CITOGENÉTICO MOLECULAR DOS SÍTIOS DE DNAR 18S E DE RONS EM TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *AGENEIOSUS* (SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE) DO LAGO CATALÃO - MANAUS, AM

Paulicéa Alves dos SANTOS¹; Celeste Mutuko NAKAYAMA²

¹ Bolsista PIBIC/CNPq, ² Pesquisadora/Orientadora CBIO/INPA

1. Introdução

A ordem Siluriformes é composta por cerca de 34 famílias, mais de 2.400 espécies, ocorrendo em todos os ambientes, sendo que a maioria de seus representantes é de água doce. Na região neotropical ainda ocorrem algumas famílias, como Auchenipteridae e Aspredinidae, que apresentam espécies estuarinas. A família Ageneiosidae está agora incluída em Auchenipteridae. Já Britiski (1972) focou seu estudo nos auchenipterídeos e ageneiosídeos, considerando que essas duas famílias formavam um grupo natural caracterizado pela presença de dimorfismo sexual. *Ageneiosus* é um gênero da família Auchenipteridae (Ferraris Jr. 2003) e são peixes que possuem porte grande de 100g a até 2 kg, cabeça achatada, olhos em posição lateral, boca muito grande, prognata com a maxila superior um pouco maior do que a inferior, distribuí-se por toda a região amazônica e ocorre tanto em lagos quanto em rios (Santos *et al.*, 2006). Este gênero é composto por 11 espécies válidas, porém as mais comumente encontradas são: *Ageneiosus atronatus*, *A. brevis*, *A. inermis* e *A. ucayalensis* (Ferraris Jr., 2003). As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) têm sido muito estudadas em organismos eucarióticos e com isso estão sendo elucidados vários problemas tanto a nível molecular como evolutivo nos organismos (Amemiya e Gold, 1986; Galetti Jr. *et al.*, 1984; Feldberg *et al.*, 1999). O ribossomo eucariótico é uma estrutura complexa e contém aproximadamente 70 proteínas e quatro moléculas de rRNA. As moléculas de rRNA 18S, 28S e 5,8S são sintetizadas pela RNA polimerase no nucléolo (Markova *et al.*, 1997; Rivera-León e Gerbi, 1997). Este projeto tem como objetivo caracterizar três espécies do gênero *Ageneiosus* com base em marcadores citogenéticos moleculares e específicos determinar o padrão de distribuição da região organizadora de nucléolo (RONs) para as três espécies do gênero *Ageneiosus*, localizar nos cromossomos metafásicos, DNAr 18S nas três espécies de *Ageneiosus* e comparar os resultados de Ag-RONs com aqueles obtidos pelo método de FISH.

2. Material e Métodos

2.1. Material

O local de coleta dos peixes foi o Lago Catalão, este está situado próximo à cidade de Manaus, na confluência do rio Solimões com o rio Negro (Fig. 01).



Figura 1. Mapa do local de coleta, lago do Catalão – AM

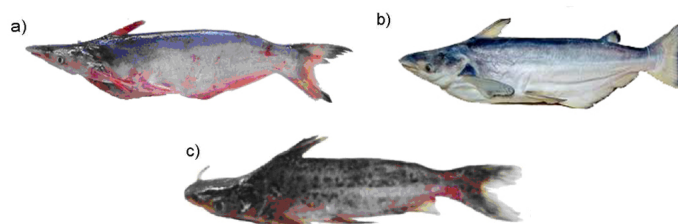


Figura 2. Exemplar de: a) *Ageneiosus dentatus* comprimento total= 14,5cm; b) *Ageneiosus brevis*, comprimento total=16,5 cm e c) *Ageneiosus sp.*, comprimento total= 12,5cm.

2.2.Métodos

2.2.1.Indução de mitoses

Para indução de mitose preparou-se uma solução de fermento biológico com 0,5g do fermento, 0,5g de açúcar e 7 mL de água conforme metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1988a).

2.2.2.Obtenção de cromossomos mitóticos

Foram obtidos cromossomos mitóticos a partir das porções anterior e posterior do rim, utilizando a técnica de “air drying” descrita por Bertollo *et al.* (1978).

2.2.3.Deteccção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

Para caracterização das RONs foi utilizada a técnica descrita por Howell & Black (1980) a qual utilizou-se uma solução de gelatina e solução de Nitrato de Prata.

2.2.4.-Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com Sondas de DNAr 18S

A localização dos sítios de DNAr 18s foi obtida pela hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando a técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986).

2.2.4.1-Preparação de sondas

Foi empregada sonda 18s obtida por PCR a partir do DNA nuclear de espécie *Prochilodus argenteus* para a localização dessas seqüências nos cromossomos de *Ageneiosus*.

2.2.4.2 Marcação de sondas

As sondas foram marcadas por Nick Translation (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, empregando-se a adenina biotilada (14 dATP- biotim – invitrogen), com posterior deteção pela avidina- FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada 490/520 nm- Sigma) e marcação direta, empregando-se ChromaTide Alexa Flúor 546 – 14 Dntp 550/570 nm – Molecular Probes.

2.2.4.3-Preparação das lâminas

As lâminas, contendo a preparação cromossômica foram lavadas em PSC, por cinco minutos, em temperatura ambiente, sofreram desnaturaçãõ alcoólica realizou-se a fixaçãõ com formaldeído e Tampãõ Fosfato Salino (PBS)

2.2.4.4-Hibridaçãõ e deteccãõ de sinais

Após a secagem ocorreu a aplicaçãõ sobre as lâminas as sondas marcadas estas permaneceram em “overnight” por 12 a 16 horas a 37°C, em câmara úmida contendo soluçãõ de formamida 60% em 2xSSC pH 7,0. O sinal de hibridaçãõ foi intensificado, ocorreram três lavagens com soluçãõ Tween 20, cinco minutos cada. Este ciclo foi novamente repetido e complementado novamente pelo tratamento com avidina-FITC e posterior lavagem com Tween 20. Em seguida, fez-se desidrataçãõ em serie de etanol a 70%, 85% e 100% a temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho.

3.Resultados e Discussãõ

As três espécies *Ageneiosus dentatus*, *A. brevis* e *A. sp* apresentaram o mesmo número diplóide $2n=56$ cromossomos e o mesmo número fundamental ($NF=104$), porém fórmulas cariotípicas totalmente distintas. As espécies *A. dentatus* e *A. sp* são mais similares. Entre *A. dentatus* e *A. sp* ocorreram as seguintes diferenças: aumento de um par de cromossomos submetacêntricos, aumento de um par de telocêntricos, aumento de dois pares de acrocêntricos. *A. brevis* é a espécie mais distinta entre as três analisadas. Isto indica que provavelmente tenham ocorrido vários rearranjos cromossômicos não Robertsonianos do tipo translocaçãõ.

Com relaçaõ às Regiões Organizadoras de Nucléolo as três espécies apresentaram apenas um par marcado pelo Nitrato de Prata e todas se localizaram na regiãõ terminal dos braçõs curtos de um par de cromossomos acrocêntricos, a maioria das espécies de Siluriformes das famílias relacionadas à *Auchenipteridae*, *Ageneiosidae* e *Doradidae*, apresentam RONs simples (Fenocchio & Bertollo, 1992).

A aplicaçãõ da sonda de DNAr 18S em *A. dentatus* aparentemente foi coincidente com a marcaçãõ na regiãõ terminal de um par de cromossomos.

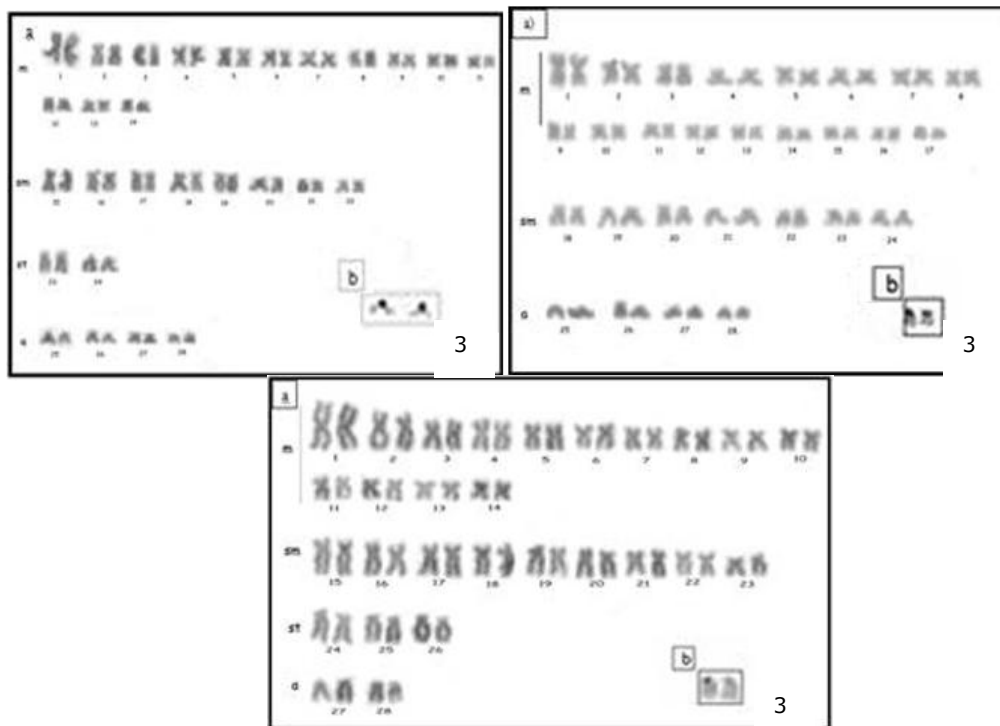


Figura 3A a) Cariótipo de *Ageneiosus dentatus* com coloração convencional em Giemsa; b) RON;
Figura 3B a) Cariótipo de *Ageneiosus brevis* com coloração convencional em Giemsa; b) RON;
Figura 3C a) Cariótipo de *Ageneiosus sp.*, com coloração convencional em Giemsa; b) RON;

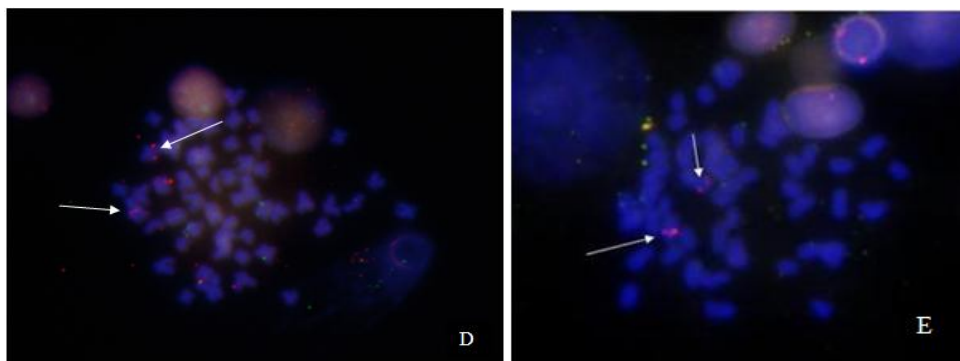


Figura D- Cariótipo de um exemplar fêmea de *Ageneiosus brevis*, com coloração DAPI evidenciando sinais fluorescentes marcados pela sonda 18S em cromossomos do tipo acrocêntricos

Figura E- Cariótipo de um exemplar fêmea de *Ageneiosus dentatus*, com coloração DAPI evidenciando sinais fluorescentes marcados pela sonda 18S em cromossomos do tipo acrocêntricos

1. Conclusão

O número diplóide de $2n=56$ cromossomos e o número fundamental $NF=104$, foram iguais para as três espécies do gênero *Ageneiosus*, porém com fórmulas cariotípicas bem distintas.

O cariótipo de *Ageneiosus dentatus* é $28m+16sm+4st+8a$; *Ageneiosus brevis* $34m+14sm+8a$ e para *Ageneiosus sp* $28m+18sm+6st+4a$.

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) mostraram um padrão de Rons simples, as marcações foram localizadas em posição terminal de um par de cromossomos acrocêntricos para as três espécies.

A FISH evidenciou sinais fluorescentes das sondas 18S em cromossomos do tipo acrocêntricos sendo positiva para as Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).

5. Referências Bibliográfica

- Amemiya, C.T. & Gold, J.R. 1986. Chromomycin A stains nucleolus organizer regions of fishes chromosomes. *Copeia* 1: 226-231.
- Britisk, H.A., 1972. Sistemática e Evolução dos *Auchenipteridae* e *Ageneiosidae* (Teleostei, Siluriformes). Tese para obtenção do grau de Doutor e Ciências. Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 141pp.
- Bertollo, L.A.C.; et al. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) Brazil. *J.Genet.* 7: 103-120.
- Feldberg, E. Porto, JIR, Santos, E.P. e Valetim, F.C. (1999) Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the central Amazon. *Genet. Mol. Biol.*, 22(3): 351-356.
- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C 1992. Karyotype, C-bands and NORs of the Neotropical Siluriform fishes *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios*, 72:19-22.
- Ferraris Jr, C.J. 2003. Family Auchenipteridae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.P.; Ferraris Jr, C.J. (Eds). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS. P.470-482.
- Galetti Jr., PM.; et al 1984. Characterization of Eight Species of Anostomidae (Characiformes) Fish on the Basis of the Nucleolar Organizer Region. *Caryologia* 37(4):
- Howel, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1104-1015.
- Markova, B.A.; et al.1997. Complex Alteration of the Ribosomal Gene Spaces Mutant of *Drosophila Melanogaster*. *Chromosoma* 106: 361-368
- Oliveira, C. et al. 1988. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Pinkel, D. et al. (1986). Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High Sensitivity, Fluorescence Hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2934-2938.
- Rivera, L. & Gerbi, S.A. 1997. The localization of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplete early pre rRNAs. *Chromosoma* 105: 506-514.
- Santos, G. et al. (2006). *Peixes comerciais de Manaus*. IBAMA, AM, PróVárzea. 144 pp.