

## ESTUDOS CITOGÊNÉTICO MOLECULAR COMPARATIVO DO DNAR 18S E RONS DE ESTOQUES SELVAGENS E DE CULTIVO DE *Colossoma macropomum* (Characidae, Serralmidae) DO LAGO CATALÃO

Ingrid Cândido de Oliveira BARBOSA<sup>1</sup>; Celeste Mutuko NAKAYAMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq, <sup>2</sup> Pesquisadora/Orientadora do INPA/CBIO.

### 1. Introdução

Os serrasalmíneos são peixes de água doce, amplamente distribuído na América do Sul, sendo abundantes nas bacias Amazônica, do Paraná-Paraguai e do Orinoco. Habitam uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios e zonas de remanso (Goulding, 1980). A alimentação varia de acordo com o seu desenvolvimento ontogenético, incluindo desde zooplâncton, insetos, frutos, até tecido carnoso de peixes e outros animais (Machado-Allison e Fink, 1996).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe amazônico muito importante para a pesca regional e uma das principais espécies cultivadas na piscicultura brasileira, onde diversos fatores favorecem a criação desses animais, como fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade. No contexto da piscicultura, o tambaqui destaca-se por seu hábito alimentar onívoro, grande plasticidade genotípica e fenotípica que permite à espécie sobreviver no heterogêneo ambiente amazônico, porém essa característica pode estar sendo perdida em populações de tambaqui cultivadas (Leitão e Val, 2003).

Em relação à citogenética, esse grupo apresenta um número diplóide variando de  $2n=54$  a  $2n=64$  cromossomos. Os gêneros *Colossoma*, *Piaractus*, *Mylossoma* e *Metynnis* apresentam quatro cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos detectadas pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs), enquanto que nos demais gêneros, esse número pode chegar até 12 (Porto *et al.*, 1989; 1991).

A técnica de FISH (hibridização *in situ* Fluorescente) envolve a preparação de sondas específicas de DNA, marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados que são diretamente fluorescentes (método direto) ou podem ser detectados pela ligação a uma molécula fluorescente (método indireto), visualizados sob a luz ultra-violeta. Tais sondas de cadeias simples de DNA são hibridizadas com os cromossomos metafásicos como nas técnicas habituais de citogenética, mas também diretamente com os cromossomos de células interfásicas (Kasahara, 2009).

### 2. Material e Métodos

Os peixes foram coletados nos seguintes pontos: lago Catalão, localizado na confluência do rio Negro com Solimões, piscicultura de Balbina e piscicultura do INPA (Figura 1). A espécie analisada foi *Colossoma macropomum* (Figura 2). Os exemplares foram coletados com malhadeira e posteriormente trazidos para o laboratório de citogenética de peixes da CBIO, onde foram todos identificados pelo pesquisador Dr. Jansen A.S. Zuanon (INPA) e mantidos em aquários bem aerados para em seguida serem sacrificados.

Para obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica "air drying" descrita por Bertollo *et al.* (1978), onde foi injetado o alcalóide colchicina nos peixes por quarenta e cinco minutos e após esse tempo foi retirado o rim posterior e anterior, foram divulsionados em Cloreto de Potássio (KCl) e levados para a estufa por trinta minutos a  $37^\circ$ , para a hipotonização e posteriormente centrifugados por três vezes no fixador recém preparado (metanol e ácido acético). Para a análise microscópica, o material foi pingado em lâminas, corado com Giemsa e as lâminas foram analisadas ao fotomicroscópio. Para obtenção das RONS foi utilizada a técnica descrita por Howel e Black (1980), em que as lâminas foram coradas com nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) sobre uma gota de gelatina e incubadas em estufa até atingir uma coloração amarelada. Para a localização dos sítios de DNAr 18s foi obtida pela hibridização fluorescente *in situ* técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986), onde sonda 18s de DNA nuclear de espécie *Prochilodus argenteus* e marcadas por Nick Translation de acordo com as instruções do fabricante.

### 3. Resultados e Discussão

Foram analisadas as metáfases de 23 indivíduos (3 fêmeas e 20 machos), sendo nove indivíduos da piscicultura de Balbina, nove indivíduos da piscicultura do INPA e cinco indivíduos machos do lago Catalão.

O número diplóide modal encontrado foi igual a 54 cromossomos e o cariótipo é constituído por  $30m+24sm$  e número fundamental  $NF=108$  para todas as localidades (figuras 1e 2). Quanto ao número de variações do padrão de Ag-RONs foram detectadas marcações múltiplas, nos braços longos de alguns cromossomos metacêntricos, estas variando de 1 e 4 marcações para indivíduos de piscicultura de Balbina e INPA, enquanto que, indivíduos do lago Catalão apresentaram sempre quatro marcações em posição terminal dos braços longos dos cromossomos metacêntricos (Fig. 2). Em relação à hibridização *in situ* (FISH), foram evidenciados dois cromossomos a mais, que não foram detectadas pela técnica de Ag-RONs, ou seja seis marcações tanto para indivíduos de piscicultura quanto indivíduos do lago Catalão (Figura 3).

No presente trabalho a espécie *Colossoma macropomum* apresentou número diplóide igual a 54 cromossomos para todos os indivíduos tanto para selvagens quanto para os de piscicultura, com número fundamental  $NF=108$ , e fórmula cariotípica de  $30M+ 24SM$ .

Análises citogenéticas de indivíduos selvagens do gênero *Colossoma* foram relatados por Nakayama *et al.* (1990). Esses autores descreveram a fórmula cariótipo de *Colossoma macropomum* com (26m+28sm) com o número diplóide 2n=54 cromossomos. Nossos dados mostram que a fórmula cariotípica é constituída de (30m+24sm), portanto o número diplóide e o número fundamental permaneceram o mesmo, o que evidencia a ocorrência de rearranjos Robertsonianos.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) estão localizadas terminalmente no braço longo dos cromossomos metacêntricos. Em relação ao padrão das regiões organizadoras de nucléolos, vem apresentado um padrão de RONs múltiplas, ou seja, a presença de um a quatro sítios ribossômicos ativos diferentes no tamanho e na intensidade das marcações, tanto para indivíduos selvagens quanto de piscicultura, características semelhantes apresentada para a família Characidae, a qual está incluída a subfamília Serrasalminae, é um grupo de peixes que apresentam sistemas simples e múltiplos de regiões organizadoras de nucléolos e de atividades variável (Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a; Nirchio *et al.*, 2003).

A aplicação da sonda de DNAr 18s em *Colossoma macropomum* resultou em sinais de fluorescência localizados nas regiões terminal dos braços longos de seis cromossomos metacêntricos, foram evidenciados dois cromossomos a mais, que não foram detectadas pela técnica de Ag-RONs provavelmente isto se deve ao fato de que estes genes estavam inativos na interfase anterior, e a técnica de hibridização fluorescente *in situ*, detecta os genes responsáveis pela organização do nucléolo presentes no genoma, independentemente dos mesmos estarem ativos ou não.

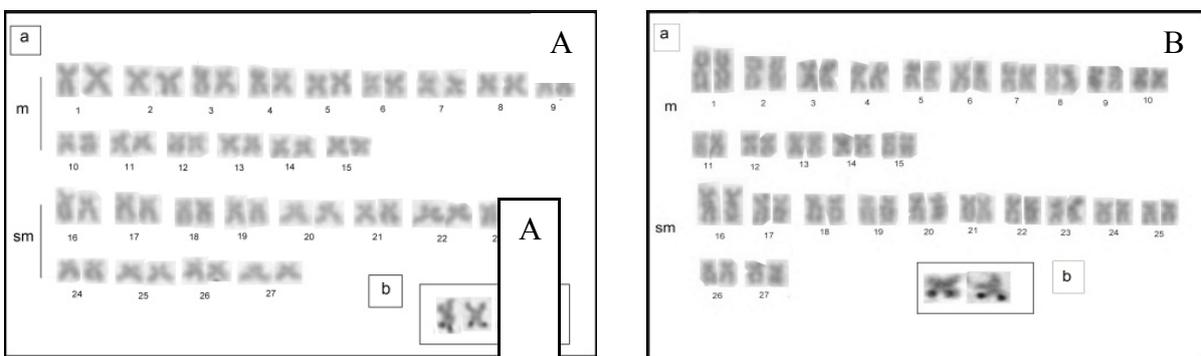


Figura 1: Cariótipos de *Colossoma macropomum* em coloração convencional com Giemsa (a) e AgRONs (b). A) indivíduos do lago suas respectivas indivíduos da com suas respectivas indivíduos da com suas respectivas

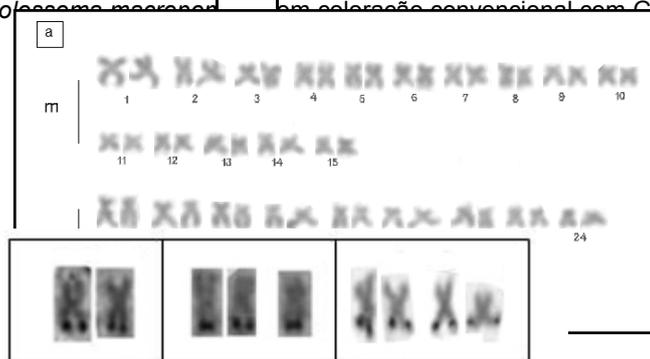


Figura 2: tabela contendo as variações de RONs encontradas nos indivíduos analisados

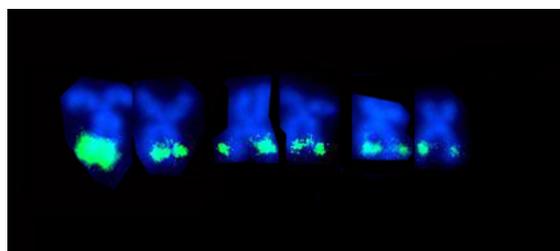


Figura 3: (FISH). Localização dos sítios de DNAr 18S.

Hibridação fluorescente *in situ*

#### 4. Conclusão

*Colossoma macropomum* apresentou o número diplóide 2n=54 cromossomos e número fundamental NF=108. Os cariótipos são de uma maneira geral, semelhantes, tanto para os exemplares selvagens quanto de piscicultura. O que confirma a sua posição mais basal na subfamília Serrasalminae.

Em relação ao padrão das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), apresentam um padrão de RON múltiplo, apresentando de um a quatro marcações no braço longo dos cromossomos metacêntricos, sendo que em

indivíduos selvagens este apresentou sempre quatro marcações nos braços longos dos cromossomos metacêntricos. Embora apresente uma tendência para uma evolução cariotípica geral mais conservativa, os dados são informativos para citotaxonomia, filogenia quando comparados com a subfamília Serrasalmíneos. A técnica de FISH (hibridização *in situ* Fluorescente), evidenciou seis marcações em posição terminal dos braços longos dos cromossomos metacêntricos, foram observadas duas marcações a mais em relação a Ag-RONs. Portanto ainda se faz necessário o aumento de montagem de cariótipos a aplicabilidade da metodologia de Hibridização “*In Situ*” Fluorescente (FISH) tanto em *Colossoma macropomum* selvagem como de piscicultura, para termos a certeza das marcações

### 5.Referências Bibliográficas

- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. & Moreira Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) *Brazil. J. Genet.* 7: 103-120.
- Centofante, L.; Porto, J.I.R. e Feldberg, E. 2002a. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. *Caryologia* 55(1): 37-45.
- Goulding, M. 1980. The Fishes and the Forest Exploration in Amazonian Natural History. University of California Press, Berkeley. 280p.
- 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.
- Kasahara, S.A, 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de invertebrados./Sanae Kassahara. 1 Ed. Ribeirão Preto, S. P. : Sociedade Brasileira de Genética, 160p.
- Leitão, M. A. B. e Val, V. M. A. F. 2003. Variabilidade de tambaqui deve ser preservada. *Ciência e Cultura*. V 55 No.1 São Paulo. Jan/Mar.
- Machado-Allison, A. 1982b. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei – Characidae). Parte I. Estudios comparados de los juveniles de las “cachamas” de Venezuela (Géneros *Colossoma* Y *Piaractus*). *Acta Biol. Venez.* 11 (3): 1-102.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R. e Feldberg 1990. Resumos de Anais Do III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Botucatu, p 23.
- Nakayama, C.M.; Jégu, M.; Porto, J.I.R. e Feldberg, E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* group (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia* 2001(3): 866-869.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R. e Feldberg, E. 2002. A comparative cytogenetic study of five piranhas species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetica* 114: 231-236.
- Nirchio, M.; Fenocchio, A.S.; Swarça, A.C.; Pérez, J.E.; Granado, A.; Estrada, A. e Ron, E. 2003. Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) and *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Caryologia* 56(4): 405-411.
- Pinkel, D. *et al.* (1986). Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High Sensitivity, Fluorescence Hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2934-2938.
- Porto, J.I.R.; Feldberg, E.; Nakayama, C.M. e Jégu, M. 1989. Análise cariotípica na família Serrasalminidae (Ostariophysi, Characiformes): Aspectos evolutivos. *Ciênc. Cult.* (supl.) 41: 714.
- Porto, J.I.R.; Feldberg, E.; Nakayama, C.M.; Maia, R.O. e Jégu, M. 1991. Cytotaxonomic analysis in the Serrasalminidae (Ostariophsi, Characiformes). *Seventh International Ichthyology Congress*: 66.