

MAPEAMENTO FÍSICO CROMOSSÔMICO EM *Geophagus proximus* (PERCIFORMES, CICHLIDAE), UTILIZANDO SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA

Brenda Natasha Gerhardt MORAES¹; Carlos Henrique SHNEIDER²; Eliana FELDBERG³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Co-orientador Doutorando - BADPI/INPA; ³Orientadora CPBA /INPA

1. Introdução

Cichlidae é uma das famílias mais estudadas entre os Perciformes e está distribuída pela África, Madagascar, Sul da Índia, Sri Lanka, Américas Central e do Sul e México (Kullander & Nijssen, 1989; Kullander, 1998). Na América do Sul ocorrem cerca de 50 gêneros e 450 espécies, que estão agrupadas em cinco subfamílias. Em Geophaginae estão alocadas as 18 espécies de *Geophagus* (Kullander, 2003). Na bacia amazônica são encontradas quatro espécies de *Geophagus*: *G. altifrons*, *G. argyrostictus*, *G. megasema* e *G. proximus* (Kullander, 2003). Citogeneticamente, as espécies desse gênero apresentam características basais da família, ou seja o número diploide igual a 48 cromossomos, maioria acrocêntricos, região organizadora de nucléolo simples e localizada nos maiores pares cromossômicos do complemento e heterocromatina distribuída na região centromérica de todos os cromossomos (Feldberg & Bertollo, 1985 a;b; Feldberg *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2008). Porém, populações apresentando localização diferencial de heterocromatina foram evidenciadas para *Geophagus proximus* da Amazônia Central, onde indivíduos do lago Catalão apresentaram marcas em todos os centrômeros e na região pericentromérica de alguns pares cromossômicos, enquanto espécimes do arquipélago de Anavilhanas apresentaram, além das marcas centroméricas, grandes blocos heterocromáticos, inclusive adjacentes à constrição secundária (Moraes *et al.*, 2009). Em ciclideos neotropicais a localização da heterocromatina parece ser um marcador efetivo na diferenciação de populações e identificação de espécies crípticas (Brum *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, 2006).

A associação da citogenética clássica com a molecular tem permitido localizar, nos cromossomos, sequências de DNA específicas (Guerra, 2004). No estudo cromossômico de peixes, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a utilização de sequências de DNA repetitivo, tais como os transposons e retrotransposons, têm-se mostrado um marcador importante, pois tem permitido novas interpretações da diversidade cariotípica, bem como da organização genômica de segmentos cromossômicos deste grupo de vertebrados (Galetti Jr & Martins, 2004). Deste modo o presente trabalho teve como objetivo identificar e mapear sequências de DNA repetitivo em duas populações de *Geophagus proximus*.

2. Material e Métodos

Foram analisados 10 indivíduos de *G. proximus* provenientes do lago Catalão e 10 do arquipélago de Anavilhanas cujas preparações cromossômicas foram realizadas por Moraes *et al.* (2009).

Para extração do DNA dos espécimes de *G. proximus* foi utilizado o tecido muscular conforme protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por comparação com marcador de concentração conhecida (Lambda DNA), em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato- EDTA). Para a obtenção das sondas do retrotransposon *Rex 3* e dos repetitivos DNAr 5S e DNAr 18S foi utilizado o DNA genômico extraído do músculo de *G. proximus*. As sondas foram obtidas da amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Saiki *et al.*, 1988), utilizando os *primers*:

- **Rex3** (RTX3-F3 5' CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG e RTX3-R3 5' TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volff *et al.*, 1999; 2001);
- **DNAr 5S** (A 5'-TACGCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Komiya & Takemura, 1979);
- **DNAr 18S** (IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT e IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.*, 2010).

As sondas obtidas foram marcadas com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo protocolo do fabricante (Bionick labeling system-Invitrogen).

Para a hidridização *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizado o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986). A montagem dos cariótipos foi feita utilizando o programa Adobe Photoshop CS3 previamente licenciado, seguindo o padrão cariotípico já determinado em Giemsa por Moraes *et al.*, (2009).

3. Resultados e Discussão

A amplificação do DNAr 5S resultou em um fragmento entre 500 e 1000 pares de bases (pb) incluindo o NTS e do DNAr 18S num fragmento em torno de 1500 pb, tamanho muito similar ao já descrito para outros ciclídeos (Teixeira *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009; 2010). Para o retrotransposon *Rex3*, o fragmento amplificado foi próximo de 1000 pb. *Rex 3* já foi estudado em outros ciclídeos neotropicais como *Symphysodon* spp. (Gross *et al.*, 2009) e *Cichla kelberi* (Teixeira *et al.*, 2009), onde o produto amplificado foi de aproximadamente 450 e 600 pb, respectivamente. Esta diferença no tamanho do fragmento entre as diferentes espécies de ciclídeos pode estar relacionada a eventos de duplicações, inserções e deleções, uma vez que elementos transponíveis tendem a escapar da pressão seletiva, pois normalmente encontram-se em regiões heterocromáticas e não codificantes.

O gene RNAr 5S, em *G. proximus* localizou-se em posição intersticial de apenas um par de cromossomos como já encontrado para outros peixes (Martins & Wasko, 2004). O gene RNAr 18S foi evidenciado, intersticialmente, nos braços curtos do primeiro par do complemento coincidente com a marcação por Nitrato de Prata. Para estes dois marcadores não houve nenhuma diferença entre os indivíduos das duas populações (Figura 1a, b; Figura 2 a, b). Com relação à localização do elemento transponível *Rex3*, indivíduos das duas populações apresentaram um padrão de distribuição disperso, com alguns cromossomos com sinais de marcação um pouco mais forte (par 2m, 3 e 5 st, Figura, 1c), mas em sua maioria os sinais foram fracos (Figura, 2c).

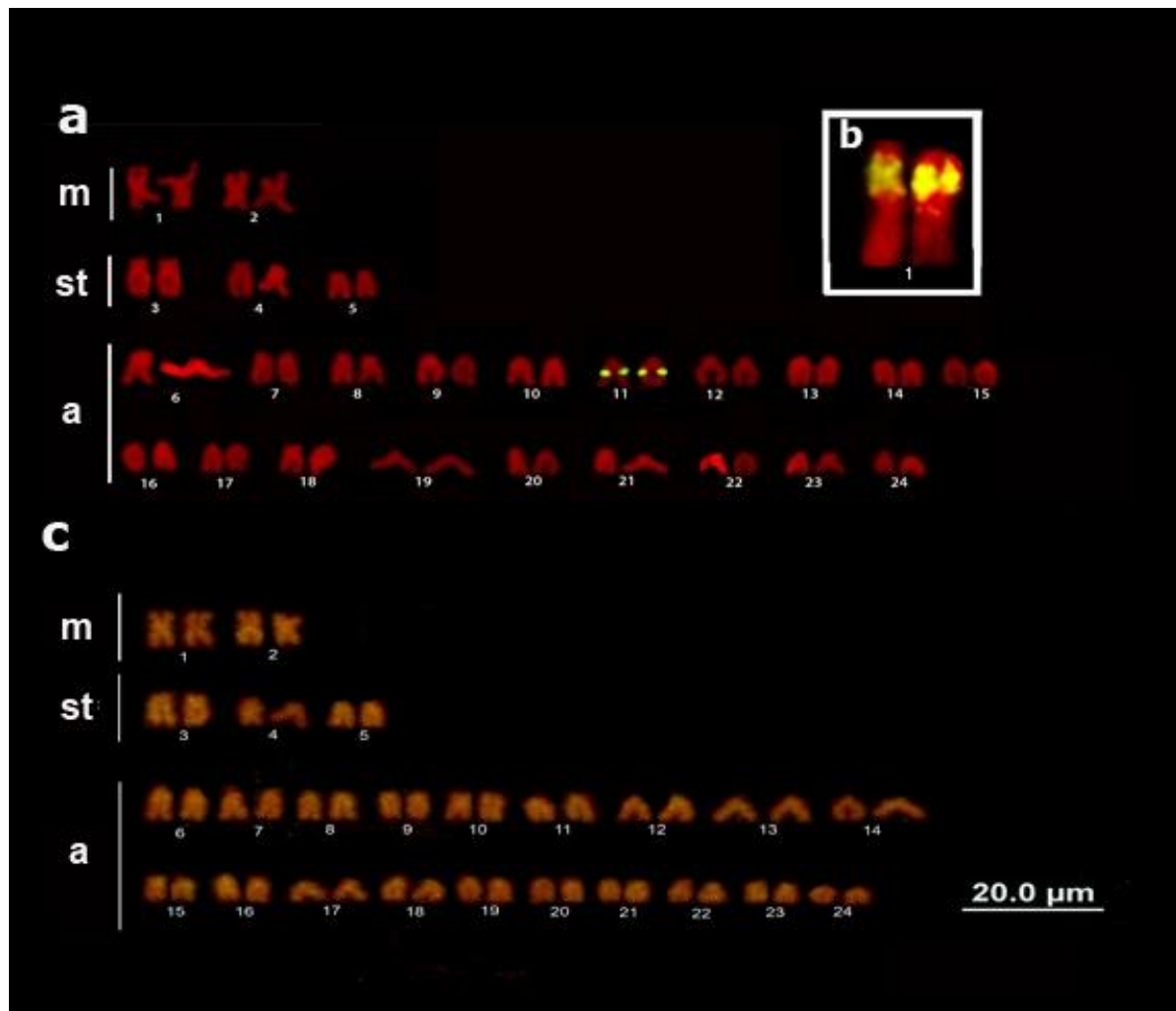


Figura 1. Localização física cromossômica do: a) DNAr 5S; b) DNAr 18S; c) retrotransposon *Rex3*. em *G. proximus* de Anavilhanas.

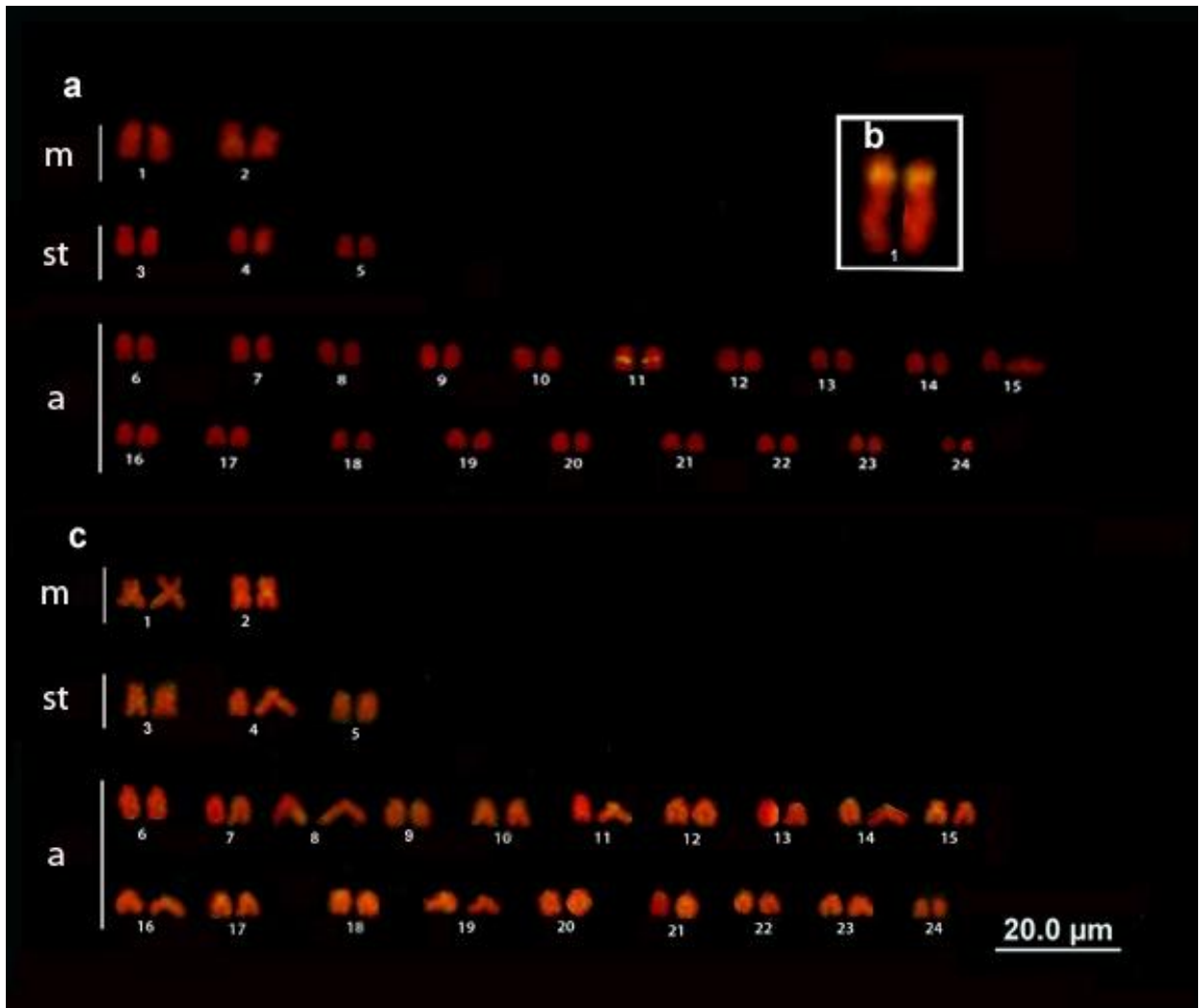


Figura 2. Localização física cromossômica do: a) DNAr 5S; b) DNAr 18S; c) retrotransposon *Rex3*. em *G. proximus* do lago Catalão.

4. Conclusão

O mapeamento físico cromossômico de *Geophagus proximus* utilizando como sondas sequências de DNA repetitivo permitiu concluir que o sítio de DNAr 5S está localizado em apenas um par cromossômico (par 11), bem como o DNAr 18S (par 1). Com relação ao elemento transponível *Rex3*, este apresentou um padrão disperso ao longo dos cromossomos com algumas marcações mais fortes na região centromérica. Ainda nenhuma diferença entre as populações foi evidenciada pelos marcadores de DNA repetitivo.

5. Referências Bibliográficas

- Brum, M.J.I.; Oliveira, C.C.; Voigt, N.; Correa, M.M.O. 1998. Karyotypic discrepancy between population of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae), including the topotypical population, with possible taxonomic implications. *Journal Comparative Biology*, 3(2): 177-184.
- Feldberg, E., Bertollo, L.A.C. 1985a. Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38(3-4): 257-268.
- Feldberg, E; Bertollo, L.A.C. 1985b. Nucleolar organizer regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38 (3-4): 319-324.
- 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.
- Galetti Jr, P.M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. In Guerra. M. (Ed) *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Editora da Sociedade Brasileira de Genética, p. 61-88.

- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2009. Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenetic Genome Research*, 127: 43-53.
- Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Valente G. T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Guerra, M. 2004. *FISH - Conceitos e aplicações na citogenética*. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 176pp.
- Komiya, H.; Takemura, S. 1979. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*, 86: 1067-1080.
- Kullander, S.O.; Nijssen, H. 1989. The cichlid of Surinam (Teleostei: Labroidei). E.J. Brill Publication, Leiden, 255pp.
- Kullander, S.O. 1998. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. p. 461-498.
- Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae. In: Reis, R.R.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. (Eds) *Check list of the freshwater of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. p. 605-654.
- Martins, C.; Wasko, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C.R. (Ed.). *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, New Hampshire, USA. p. 335-363.
- Moraes, B.N.G.; Gross, M.C.; Feldberg, E. 2009. Evolução cromossômica de *Geophagus* (Perciformes, Cichlidae) da Amazônia Central. *Anais da XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA*: 270-272
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Pires, L.B.; Caetano, L.G.; Dias, L.A. 2008. Karyotype similarities among two populations *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi River basin/PR/Brazil. *Caryologia*, 61: 1-4.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Teixeira, W.G. 2009. Identificação e caracterização de sequências repetidas de DNA no genoma de peixes ciclídeos do gênero *Cichla*. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. 102pp.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2006. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia*, 59: 260-266.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427-1438.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Meyer, A.; Schartl, M. 2001. Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. *Molecular Biology and Evolution*, 18(3): 427-431.