

**ANÁLISE DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEÓLO DAS ESPÉCIES PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*), CACHARA (*Pseudoplatystoma fasciatum*) E SEUS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS, UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA.** Fernanda Dotti do Prado, Fábio Porto-Foresti, Jehud Bortolozzi, José A. Senhorini, Fausto Foresti. – Genética – Ciências Biológicas - Departamento de Biologia - Faculdade de Ciências – Unesp – Campus de Bauru.

A hibridação interespecífica é uma das metodologias clássicas de manipulação genética tradicionalmente aplicadas nas pisciculturas mundiais e brasileiras (Toledo-Filho, *et al.*, 1994). Porém, é importante salientar que os resultados obtidos pela técnica de hibridação interespecífica precisam ser cuidadosamente interpretados e analisados, devido à grande quantidade e heterogeneidade de produtos híbridos que podem resultar dos cruzamentos interespecíficos de peixes (Toledo-Filho *et al.*, 1996), além dos possíveis riscos biológicos potenciais que os híbridos podem representar ao meio ambiente, podendo “contaminar geneticamente” estoques naturais ou cultivados, caso sejam férteis, ou ainda competir de diversas formas com as linhagens parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1999). O monitoramento genético de produtos resultantes de processos de hibridação interespecífica consiste no uso de metodologias que possibilitam encontrar características diagnósticas que identifiquem, de maneira clara e acessível, parentais e híbridos.

Foram analisados citogeneticamente 12 exemplares do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), 18 do Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), 20 exemplares do híbrido interespecífico “Pintachara” (resultante do cruzamento da fêmea do Pintado com o macho do Cachara) e 16 do “Cachapinta” (resultado do cruzamento da fêmea do Cachara com o macho do Pintado).

Os indivíduos foram obtidos do estoque de cultivo do Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, CEPTA/IBAMA (Pirassununga, SP), e posteriormente depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Bauru.

Na análise citogenética, cromossomos mitóticos foram obtidos de preparações diretas de células renais, baseado no método descrito por Foresti *et al.* (1993). A região organizadora do nucléolo (NOR) foi identificada pela coloração com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980), detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC com a técnica que emprega o corante Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) (Schweizer, 1976) e a técnica de FISH utilizando sonda fluorescentes do gene DNAr 18S (Pinkel *et al.*, 1986; Porto-Foresti *et al.*, 2002).

A partir da coloração convencional com Giemsa, foi observado o número diplóide constante de 2n=56 cromossomos, para parentais e híbridos, variando apenas a fórmula cariotípica, composta por 18 cromossomos do tipo metacêntricos, 18 submetacêntricos, 8 subtelocêntricos, 12 acrocêntricos, e número fundamental (NF) igual a 92 para o Pintado, 22 metacêntricos, 12 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos, com NF= 90 para o Cachara. Os híbridos apresentaram uma fórmula cariotípica intermediária à dos parentais, com 20 cromossomos metacêntricos, 15 submetacêntricos, 9 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos e NF= 91. Os indivíduos analisados não apresentaram heteromorfismo cromossômico sexual.

Na espécie parental Pintado, a análise da NOR revelou, através da Impregnação com Nitrato de Prata, marcações na região telomérica do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico, apresentando polimorfismo de tamanho, assim como as técnicas de Cromomicina e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). No Cachara a NOR também estava localizada em um par cromossômico do tipo submetacêntrico, abrangendo a região telomérica do braço curto, com polimorfismo de tamanho para as três técnicas. Nos híbridos “Pintachara” e “Cachapinta” a NOR foi observada na região telomérica do braço curto de dois cromossomos submetacêntricos, apresentando polimorfismo de tamanho, assim como o observado nos parentais, sendo que a Cromomicina e o FISH confirmaram estes resultados.

Análises citogenéticas no gênero *Pseudoplatystoma* demonstram uma grande estabilidade cariotípica, evidenciada pelo fato de que todas possuem 2n=56 cromossomos, assim como o observado no presente trabalho. Entretanto, este grupo de peixes apresenta um número fundamental

variando de 88 a 100, e diferentes fórmulas cariotípicas descritas para cada população (Porto-Foresti *et al.*, 2000; Bigoni *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1997; Swarça *et al.*, 2005).

Segundo Swarça *et al.* (2005), o cariótipo dos exemplares de Pintado da bacia do Paraguai é constituído por 20M+16SM+8ST+12A (NF=100). Já na bacia do Paraná, a autora descreveu, para a mesma espécie, um cariótipo de 26M+10SM+6ST+14A e (NF=98). Outros cariótipos também já foram descritos para *Pseudoplatystoma corruscans*, como a fórmula de 18M+18SM+10ST+10A (NF=92) (Bigoni *et al.*, 1992) e 24M+16SM+8ST+8A (NF=96) (Souza *et al.*, 1997).

Os dados encontrados na literatura para a espécie *Pseudoplatystoma fasciatum* (Cachara) também demonstram diferentes cariótipos descritos para cada população, como Porto-Foresti *et al.* (2000), que descreveram um cariótipo composto por 20M+12SM+12ST+12A, e NF=88, e Fenocchio e Bertollo (1992), que, analisando *Pseudoplatystoma fasciatum* do Rio Solimões (AM) relataram uma forma cariotípica de 18M+14SM+10ST+14A, e NF=88.

Os cariótipos apresentados no presente trabalho, para as espécies Pintado e Cachara, diferem do descrito na literatura pelos autores acima citados, podendo representar pequenas alterações ocorridas nos cromossomos ao longo do processo de especiação, além de não podermos descartar uma interpretação diferenciada no processo de montagem dos cariótipos, com a ocorrência de diferenças devidas a variações no processo de elaboração das preparações cromossômicas ou de julgamento nas medidas dos cromossomos, já que essas diferenças são tênues e minuciosas.

Através da coloração com Giemsa foi possível observar diferenças nos cariótipos dos híbridos em relação ao cariótipo dos parentais, e os cromossomos não pareados podem ser considerados como uma característica diagnóstica de exemplares híbridos. Porém, o seu uso como marcador citogenético pode não ser recomendável pois há possibilidade de ocorrerem diferentes interpretações cariotípicas, de acordo com os diversos graus de condensação cromossômica, não sendo possível encontrar um padrão cariotípico que diferencie de maneira clara a morfologia cromossômica entre híbridos e parentais.

Na ordem Siluriformes a presença de NORs simples, é a situação mais frequentemente observada, sendo considerada uma condição primitiva para estes peixes (Oliveira e Gosztoyie, 2000). Este padrão de NOR simples foi observado em todos os espécimes deste estudo, apresentando um único par cromossômico envolvido com a região organizadora de nucléolo, sendo que a ocorrência de marcações similares no Pintado e na Cachara (região telomérica do braço curto de um par submetacêntrico) revelam um caráter conservativo da NOR para estas espécies de peixes.

O fato de que nas preparações cromossômicas das espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum*, tenha sido observado um heteromorfismo de tamanho das NORs entre os cromossomos homólogos, representa um evento de ocorrência bastante comum nos organismos e também entre os peixes (Foresti *et al.*, 1981). A ocorrência deste heteromorfismo de NORs já foi relatada para outros Siluriformes (Oliveira e Gosztonyie, 2000; Alves, 2000), parecendo ser um evento comum entre as espécies do “subgrupo” Sorubiminae, pertencentes à família Pimelodidae, conforme descrito para *Pirinampus pirinampu* e *Zungaro zungaro* (Swarça *et al.*, 2001), *Steindachneridion* sp, *Steindachneridion scripta* e *Zungaro Zungaro* (Swarça, 2003), e *Pseudoplatystoma corruscans* (Swarça *et al.*, 2005).

A presença de heteromorfismo de tamanho da NOR, confirmadas através da coloração com cromomicina CMA<sub>3</sub> e Hibridação *in situ* (FISH) pode indicar que houve uma duplicação desta região nos cromossomos homólogos, e também possivelmente está relacionado à atividade dos cístrons robossomais.

Os híbridos analisados, possivelmente receberam um cromossomo portador da NOR do Pintado e o outro da Cachara. Entretanto, a NOR dos parentais é muito similar, tornando-se difícil diferenciar a origem destes cromossomos nos híbridos.

O emprego de marcadores citogenéticos, como os utilizados no presente trabalho, pode ser utilizado na caracterização das espécies parentais e das linhagens de híbridos interespecíficos artificiais, no intuito de contribuir para o melhor entendimento da dinâmica da hibridação interespecífica em peixes e também de fornecer subsídios para projetos de hibridação a serem desenvolvidos em pisciculturas e na orientação de programas de conservação biológica.

## Referências Bibliográficas

- Alves AL (2000) *Análise e evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichtiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial*. Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, 129 p. Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências de Botucatu.
- Bigoni APV, Almeida-Toledo LF e Toledo Filho SA (1992) Estudos citogenéticos em *Pseudoplatystoma coruscans* (Pimelodidae, Sorubiminae) do rio Mogi Guaçu, SP. In: IV Simp. Citog. Evol. Aplic. Peixes Neotropicais p 32.
- Fenocchio AS e Bertollo LAC (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69: 41-46.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF e Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31: 137-144.
- Foresti F, Oliveira C e Almeida-Toledo, LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Howell WM e Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Oliveira C e Gosztanyi AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion on chromosome evolution in siluriforms. *Caryologia* 53(1): 31-37.
- Pinkel D, Straume T e Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:2934-2938.
- Porto-Foresti F, Alves AL, Oliveira C e Foresti F (2002) Evidências de hibridação natural entre citótipos de  $2n=44$  e  $2n=46$  cromossomos de *Synbranchus marmoratus* (SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANCHIDAE). In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes p 9.
- Porto-Foresti F, Andreata AA, Oliveira C e Foresti F (2000) The Karyotype of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes) from the Rio Paraguay basin. *Chromosome Science* 4: 99-102.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and Dapi. *Chromosoma* 58:307-324.
- Souza AB, Fonseca CG, Ribeiro LP e Pinheiro LEL (1997) Análise cromossômica do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* das bacias dos rios São Francisco e Paraguai. In: *Surubim* (ed. Miranda, M.O.T.), pp. 57-68, IBAMA, Belo Horizonte.
- Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM e Dias LA (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 16 (4): 325-330.
- Swarça AC, Giuliano-Caetano L e Dias AL (2001) Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 110: 97-100.
- Swarça, AC (2003) *Contribuição à citogenética dos Pimelodidae de grande porte: Estudos cariotípicos de 4 espécies do "subgrupo" Sorubiminae*. Tese de Doutorado - Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná 149p.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardino G e Calcagnotto D (1994) Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. *Cadernos de Ictiogenética* 2, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Calcagnotto D, Santos SBAF e Bernardino G (1999) Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética* 4, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Foresti F e Almeida-Toledo LF (1996) Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética* 3, CCS/USP, São Paulo.

**Bolsa:** FAPESP.