

VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO EM HÍBRIDOS “PIAUPARA”, UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA.

Fernanda Rodrigues Cugola, Fabio Porto-Foresti, Diogo Teruo Hashimoto, Jehud Bortolozzi, Fausto Foresti – Genética – Ciências Biológicas – Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências – Campus de Bauru - Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

Dentre os programas de manipulação genética desenvolvidos dentro de pisciculturas, um que vem se destacando ultimamente por apresentar resultados favoráveis é a hibridação interespecífica, que possibilita o aumento da produtividade e a obtenção de linhagens estéreis. Esses resultados de hibridação, porém, devem ser cuidadosamente interpretados devido à grande heterogeneidade que os produtos híbridos podem apresentar. Outro aspecto relevante diz respeito aos riscos biológicos potenciais que os híbridos podem representar ao meio ambiente, podendo contaminar “geneticamente” estoques naturais ou cultivados. Por essas razões, o uso de metodologias que permitam identificar acessível e claramente exemplares parentais de híbridos têm sido empregadas a fim de se entender melhor a dinâmica da hibridação interespecífica. No presente estudo, foram inicialmente identificadas citogeneticamente as espécies parentais Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e Piapara (*Leporinus elongatus*), ambas as espécies apresentando cariótipo básico composto por 54 cromossomos, dos tipos meta e submetacêntrico, número fundamental igual a 108 e apresentando heteromorfismo cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW. O híbrido “Piaupara”, resultante do cruzamento da fêmea do Piaçu com o macho da Piapara, apresentou o mesmo número diplóide e fórmula cariotípica encontrada em seus parentais *Leporinus macrocephalus* (Piaçu) e *Leporinus elongatus* (Piapara), apresentando também heteromorfismo cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW. No presente estudo, as análises dos parentais apresentaram um cariótipo semelhante em número e morfologia, indistinguíveis através das análises citogenéticas após coloração com Giemsa. Logo, o mesmo resultado foi encontrado no híbrido “piaupara”, demonstrando cariótipo com $2n=54$ cromossomos e morfologias dos tipos meta e submetacêntricos, não sendo possível diferenciar exemplares híbridos de parentais.

O emprego de técnicas de colorações diferenciadas, como é o caso da detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo pela impregnação com nitrato de Prata, permitiram de forma determinante, no presente estudo, diferenciar os cariótipos de exemplares híbridos e parentais que, quando corados anteriormente com Giemsa, se demonstraram iguais em número e morfologia. Através da coloração pela impregnação pela Prata realizada em exemplares das espécies *Leporinus macrocephalus* e *Leporinus elongatus*, foi observada a presença de apenas um par de cromossomos portador de cístrons ribossômicos para ambas as espécies, sendo que a NOR simples está localizada em um par cromossômico do tipo submetacêntrico em exemplares da espécie *Leporinus macrocephalus* (Piaçu), com marcação terminal no braço longo e em um par cromossômico do tipo submetacêntrico em exemplares da espécie *Leporinus elongatus* (Piapara), com marcação terminal no braço longo. Contudo foi observada uma diferença com relação ao tipo de morfologia dos cromossomos, indicando que não são homólogos. Nos exemplares do híbrido “piaupara”, observou-se a seguinte distribuição de cromossomos portadores de cístrons ribossômicos: 12,99% das células analisadas apresentaram NOR em um par cromossômico submetacêntrico, com marcação terminal no braço longo, contudo observou-se diferença com relação ao tipo de morfologia dos cromossomos, indicando que não são homólogos, sendo um proveniente de *Leporinus*

elongatus e o outro de *Leporinus macrocephalus*; 86,47% das células analisadas apresentaram NOR em apenas um cromossomo do par, o qual foi identificado como sendo proveniente de *Leporinus elongatus* e 0,75% das células também tiveram NOR em apenas um cromossomo do par, porém, este foi identificado como sendo de *L. macrocephalus*. Esses resultados mostraram que é possível identificar os híbridos interespecíficos de seus parentais através da técnica de marcação com nitrato de Prata (NOR). Esses dados foram observados em outros relatos na literatura, como o caso do híbrido da espécie *Synbranchus marmoratus*, entre dois citótipos de $2n=44$ e $2n=46$ na qual se observou que havia a marcação de NOR em apenas um único cromossomo submetacêntrico, cujo par de cromossomos portadores de NOR era encontrado no parental com citótipo $2n=44$, e assim o provável cromossomo portador da NOR do citótipo $2n=46$ foi considerado inativo nas células do híbrido, que apresentava $2n=45$ cromossomos. A utilização de uma técnica mais específica para a identificação das regiões organizadoras de nucléolo possibilitou que os cromossomos portadores da NOR do citótipo $2n=46$, não identificados pelo nitrato de Prata no híbrido, fossem observados através da hibridação *in situ* utilizando sondas do gene ribossômico 18S.

No presente estudo, a aplicação de técnicas mais específicas, como a Cromomicina CMA₃ e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), permitiram observar a presença das NORs ativas e inativas nos exemplares parentais e híbridos. Através da coloração por cromomicina CMA₃, observou-se a presença de NOR simples em um par cromossômico submetacêntrico com marcação telomérica nos braços longos em ambas as espécies parentais, correspondendo às mesmas regiões organizadoras de nucléolo já identificadas anteriormente através do nitrato de Prata. Nos exemplares híbridos “Piaupara”, observou-se a presença de um par cromossômico submetacêntrico portador da NOR, de morfologias diferentes, com marcação telomérica no braço longo. Contudo foi observada uma diferença com relação ao tipo de morfologia dos cromossomos, indicando que não são homólogos, sendo um cromossomo proveniente da espécie parental *Leporinus elongatus* e o outro proveniente da espécie parental *Leporinus macrocephalus*, conforme observado pela técnica utilizando o corante nitrato de Prata. A associação de técnicas de coloração cromossômica, como nitrato de Prata e fluorocromos GC-específicos, é extensivamente usada para a identificação das NORs em peixes, uma vez que essa associação permite comparar NORs ativas e inativas respectivamente, como em estudos com espécies de peixes do gênero *Pimelodus* e *Brycon*, que permitiram identificar marcações coincidentes com os locais Ag-NORs, onde também não se observou nenhuma outra região positiva para o CMA₃, como observado para as espécies parentais no presente trabalho.

Análises das NORs com hibridação *in situ* fluorescente em *Leporinus elongatus* e *Leporinus macrocephalus*, usando sondas de rDNA 18S, confirmaram os locais autossômicos de rDNA, assim como sua localização em um par de cromossomos submetacêntricos para ambas as espécies parentais. A detecção da NOR simples num par cromossômico submetacêntrico corrobora com os resultados obtidos pela coloração com nitrato de prata e fluorocromo GC-específico. O mesmo resultado foi encontrado no híbrido “Piaupara”, que apresentou marcação num par de cromossomos metacêntricos, sendo estes de morfologias diferentes, indicando serem provenientes de cada parental, confirmando o resultado já obtido pelo fluorocromo GC-específico. A frequência da NOR observada nos híbridos com coloração pelo nitrato de prata não foi observada com o uso da cromomicina CMA₃ e nem por FISH, o que pode indicar ser efeito de dominância nucleolar, uma vez que o nitrato de prata se associa a proteínas nucleolares envolvidas com a atividade transcricional dos genes ribossomais e não diretamente ao DNAr, portanto, grande parte da variação detectada pode ser associada à

atividade destes cístrons. Agrupamentos de DNAr 45S negativos à prata sugerem que esses segmentos de DNA não apresentam atividade transcricional perceptível pela coloração com prata ou podem estar representando resquícios não funcionais de segmentos de DNAr 45S.

Um exemplo de estudo envolvendo a associação de Ag-NOR, CMA₃ e FISH, para detecção de NORs ativas e inativas, feito com *Leporinus friderici* permitiu identificar as NORs, depois de coradas com nitrato de prata, com marcações em mais de cinco cromossomos em um indivíduo, diferentemente do observado anteriormente para essa espécie, que apresentava Ag-NORs no braço curto de apenas um cromossomo do complemento. Análises usando coloração por CMA₃ confirmaram a marcação no braço curto do cromossomo como também se mostrou positiva para outras bandas que eram marcadas esporadicamente, apresentando variação numérica e, novamente, o mesmo resultado sendo observado quando os cromossomos foram submetidos à hibridação *in situ* com sonda rDNA 18S. Os autores acreditam que esses resultados indicam que essas modificações ocorrem no nível dos cístrons rDNA.

Outro estudo envolvendo a associação dessas três técnicas permitiu confirmar um heteromorfismo de tamanho da NOR em cinco espécies de peixes da ordem Pleuronectiformes, que depois de detectadas por nitrato de Prata, foram confirmadas através da CMA₃ e hibridação *in situ* com sonda rRNA 18S.

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes para identificação das NORs nos cromossomos dos peixes, tem se tornado cada vez mais comum e os resultados obtidos geralmente têm confirmado e ampliado os dados anteriormente obtidos com outras técnicas. Em vários trabalhos onde têm sido utilizadas, simultaneamente, as técnicas de bandeamento NOR e FISH com sondas de rDNA, os resultados têm demonstrado que os dados obtidos por ambas são correspondentes, conforme observamos no presente trabalho.

Os resultados apresentados no presente estudo, realizados nos híbridos interespecíficos, analisando as técnicas com corante cromomicina CMA₃ e Hibridação *in situ* (FISH) só vem a confirmar os resultados obtidos na técnica de impregnação pela Prata (NOR).

Apoio Financeiro: FAPESP.