

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**CITOTAXONOMIA COMPARATIVA DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES  
DO GÊNERO *Satanoperca***

Bolsista: Francijara Araújo da Silva, CNPq

MANAUS  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B/0024/2011

**CITOTAXONOMIA COMPARATIVA DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES  
DO GÊNERO *Satanoperca***

Bolsista: Francijara Araújo da Silva, CNPq  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Claudia Gross, UFAM  
Co-orientador: MSc. Carlos Henrique Schneider, INPA

MANAUS  
2012

## RESUMO

A família Cichlidae ocupa o quarto lugar entre os peixes quanto ao número de espécies e na América do Sul são conhecidas cerca de 290 espécies válidas, distribuídas em 39 gêneros, sendo mais da metade na bacia amazônica. Este grupo tem passado por algumas revisões taxonômicas nas últimas décadas e até a década de 90, espécies do gênero *Satanoperca* estavam alocadas no gênero *Geophagus*. Considerando que a distinção dos táxons é fundamental para estabelecer a sistemática e taxonomia correta, uma abordagem citogenética clássica e molecular foi efetuada em duas espécies amazônicas de *Satanoperca* para revelar a organização e evolução dos seus genomas. Foram analisados 12 indivíduos de *Satanoperca jurupari* (8 ♂ e 4 ♀) e 6 indivíduos de *Satanoperca lilith* (3 ♂ e 2 ♀) coletados no rio Negro e no lago Catalão, localizado na confluência do rio Negro e Solimões, AM. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por meio da impregnação com nitrato de prata e a detecção da distribuição da heterocromatina (Banda C) pela ação do hidróxido de bário. A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi efetuada utilizando sondas de DNA ribossomais 18S, 5S e telomérica. Para ambas as espécies o número diplóide encontrado foi  $2n = 48$  cromossomos. *Satanoperca jurupari* apresentou 4 m-sm + 44 st-a, com o número fundamental (NF) igual a 52, região organizadora de nucléolo múltipla, com marcações no braço curto de ambos os homólogos do par 6 (st-a) e na região terminal de ambos os homólogos do par 9 (st-a), confirmados também pela FISH com sondas ribossomais 18S, enquanto que os sítios de DNA ribossomal 5S estão localizados nos homólogos do par 7. Sítios teloméricos intersticiais não foram evidenciados para a espécie e blocos heterocromáticos localizados na região terminal foram encontrados nos braços curtos de alguns cromossomos e na região pericentroméricas da maioria dos pares. Para *Satanoperca lilith* a fórmula cariotípica encontrada foi 4 m-sm + 44 st-a, com o número fundamental (NF) igual a 52, havendo

presença de um cromossomo supranumerário em algumas metáfases de um indivíduo desta espécie. Sítios ribossomais 18S foram visualizados na região terminal de um dos homólogos do par 1 (m-sm) e na região do braço curto de ambos os homólogos do par 7 (st-a), corroborando os dados obtidos pela impregnação com nitrato de prata e sítios de DNA ribossomal 5S foram localizados nos homólogos do par 5, também não foram evidenciados sítios teloméricos intersticiais. A heterocromatina constitutiva apresentou-se tênue e distribuída nas regiões pericentroméricas dos cromossomos. Estes dados mostram que *Satanoperca* apresenta características cromossômicas que permitem a individualização de suas espécies, bem como sua distinção de *Geophagus*, uma vez que apresentam características cromossômicas derivadas, tais como múltiplos sítios de DNAr 18S e heterocromatina distribuída além de regiões pericentroméricas.

## Abstract

Subfamily Cichlinae ranks the fourth place among the fishes in number of species. In South America know about 290 valid species, distributed in 39 genera. More of the half of these species is in Amazon Basin. Taxonomic reviews were done in this group recently, as done in *Satanoperca* spp. and *Geophagus* spp. previously species from genus *Satanoperca* were inside of genus *Geophagus*. Thus, studies which help in taxa distinction are very important to establish the correct systematic and taxonomy and the cytogenetic is an excellent tool for this purpose. Classical and molecular cytogenetic studies were done to define the genome organization and evolution of *Satanoperca* amazon species. We analyzed 12 specimens of *Satanoperca jurupari* (8 ♂ and 4 ♀) and 5 specimens of *Satanoperca lilith* (3 ♂ and 2 ♀) collected in Negro river and Catalão lake, which is located at the confluence of the rivers Negro and Solimões. Chromosomes mitotic were obtained from kidney cells, nucleolus organized regions (NORs) were detected by silver nitrate staining and heterochromatin was analyzed by C-banding. Sites of 18S rDNA was mapping by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Both of species have diploid number as  $2n = 48$  chromosomes. *Satanoperca jurupari* had 4m-sm+44st-a, with fundamental number (FN) as 52, multiple nucleolus organized regions, with marking in the short arm in both of homologues pair 6 (st-a) and in the terminal region of both homologues pair 9 (st-a), which are confirmed by FISH with 18S rDNA probe. Heterochromatic blocks are located in pericentromeric region in most part of chromosomes and at terminal regions of short arms of some pairs. *Satanoperca lilith* presented 4 m-sm + 44 st-a, with fundamental number (FN) equals 52. One supranumerary chromosome is present in some metaphases of two specimens of *S. lilith*. Sites of 18S rDNA were observed in the terminal region of one of the homologues pair 1 (m-sm) and in the region of short arm in both homologues pair 7 (st-a). The silver nitrate impregnation marks are coinciding with 18S rDNA sites. The tenuous blocks of constitutive heterochromatin are present in pericentromeric regions of all chromosomes. These data shows that group doesn't have karyotype organization stable, because there are chromosomal rearrangements in karyotype evolution.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Espécies de *Satanoperca* da bacia Amazônica. A) *Satanoperca acuticeps*; B) *S. daemon*; C) *S. lilith*; D) *S. papaterra*; E) *S. jurupari* .....2

**Figura 2.** Cariótipo da espécie *S. jurupari*. a) Coloração convencional com Giemsa; b) Distribuição da heterocromatina constitutiva revelada pelo tratamento com hidróxido de bário (banda C); c) Impregnação com Nitrato de Prata sequencial evidenciando em destaque os pares cromossômicos portadores da RON; d) Sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos); e) sítios de DNAr 18S (sinais amarelos); f) Ausência de sítios teloméricos intersticiais (sítios teloméricos em vermelho). Barra: 10 µm.....14

**Figura 3.** Cariótipo da espécie *S. lilith* a) Coloração convencional com Giemsa; b) Distribuição da heterocromatina constitutiva revelada pelo tratamento com hidróxido de bário (banda C); c) Impregnação com Nitrato de Prata sequencial evidenciando em destaque os pares cromossômicos portador da RON; d) Sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos); e) sítios de DNAr 18S (sinais amarelos); f) Ausência de sítios teloméricos intersticiais (sítios teloméricos em vermelho). Barra: 10 µm.....15

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	4
2.1 Material .....	4
2.2 Métodos .....	4
2.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos .....	4
2.2.2 Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos .....	5
2.2.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolo - RONS .....	5
2.2.4 Detecção da heterocromatina constitutiva - Banda C .....	6
2.2.5 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> - FISH .....	7
2.2.5.1 Extração do DNA .....	7
2.2.5.2 Obtenção das sondas via PCR e marcação por kit nick translation .....	7
2.2.5.3 Hibridização cromossômica .....	8
2.2.6 Análise cariotípica .....	10
3. Resultados .....	12
4. Discussão .....	14
5. Referências Bibliográficas .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

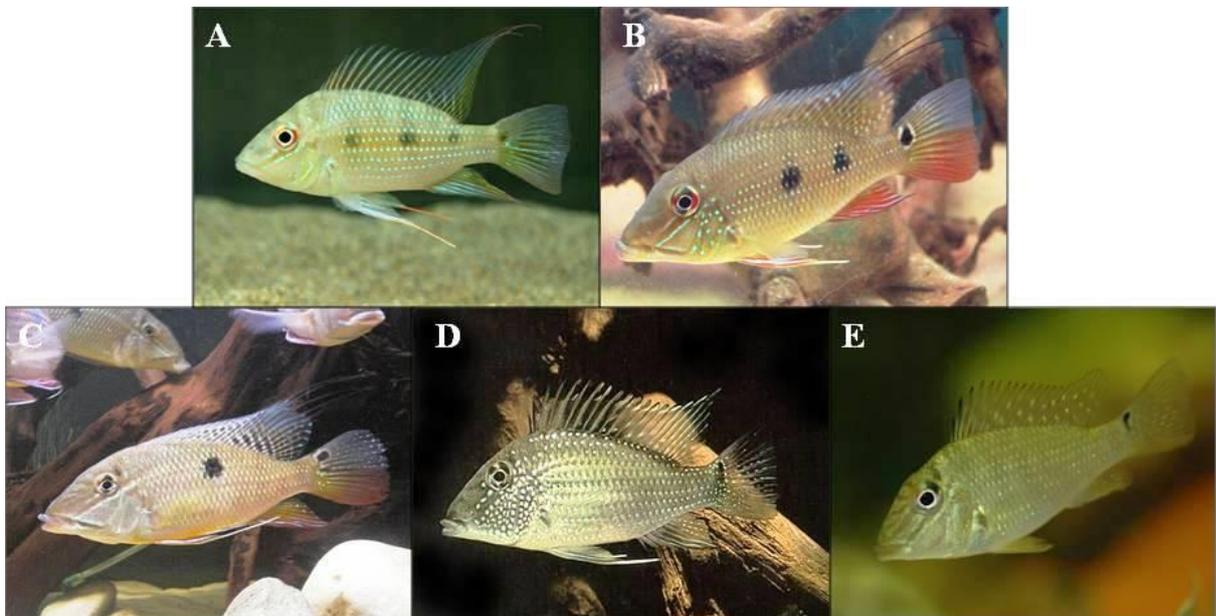
Os peixes apresentam grande diversidade morfológica, ocupam uma ampla diversidade de habitats e apresentam uma história evolutiva bastante peculiar. Essas características fazem com que a compreensão da sua sistemática e história evolutiva seja um tema ainda sujeito a muita discussão, tornando-os um excelente material básico nos estudos voltados a questões adaptativas, taxonômicas e evolutivas (Nelson, 2006).

Dentre as espécies de peixes utilizadas para diversos estudos encontram-se os ciclídeos. Pertencente à ordem Perciformes, a família Cichlidae ocupa o quarto lugar quanto ao número de espécies, abrangendo cerca de 230 gêneros e 1.292 espécies distribuídas por todas as Américas, África, Madagascar e Índia. Ainda, os ciclídeos são considerados um grupo monofilético (Kullander, 1998), que destaca-se pelo grande sucesso evolutivo e alta taxa de especiação e especialização (Lowe-McConnell, 1969; Liem, 1974; Kornfield, 1978; Kornfield *et al.*, 1979; Thompson, 1979).

Apesar da distribuição da família Cichlidae ocorrer nos diferentes continentes, o maior número de espécies está presente na região dos grandes lagos no leste da África (Kocher, 2004), porém as espécies neotropicais apresentam níveis significativamente maiores de variação genética do que os africanos, apesar da menor diversidade em espécies (Farias *et al.*, 2000).

Na América do Sul são conhecidas cerca de 290 espécies válidas distribuídas em 39 gêneros, sendo que mais da metade ocorre na bacia amazônica (Kullander, 1998; 2003). Contudo, este grupo tem passado por algumas revisões taxonômicas nas últimas décadas, tais como as efetuadas por Kullander & Ferreira (1988), que distinguiram o gênero *Satanoperca* do gênero *Geophagus*.

Atualmente o gênero *Satanoperca* (tribo Geophagini, subfamília Geophaginae) compreende sete espécies: *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840), *S. daemon* (Heckel, 1840), *S. acuticeps* (Heckel, 1840), *S. papaterra* (Heckel, 1840), *S. lilith* (Kullander & Ferreira, 1988), *S. leucosticta* (Muller & Troschel, 1849) e *S. mapiritensis* (Fernandez-Yepes, 1950), as quais estão distribuídas por toda a América do Sul, sendo que na bacia amazônica ocorrem apenas cinco: *S. acuticeps*, *S. daemon*, *S. jurupari*, *S. lilith* e *S. papaterra* (**Figura 1**). Entretanto, a distribuição de *S. papaterra* se estende no rio Guaporé, na divisa de Brasil com Bolívia e bacia do Paraná-Paraguai (Kullander, 2003).



**Figura 1** – Espécies de *Satanoperca* da bacia Amazônica. A) *Satanoperca acuticeps*; B) *S. daemon*; C) *S. lilith*; D) *S. papaterra*; E) *S. jurupari*. Retirado de <<http://www.cichlidae.com>> Acesso em 22 de outubro 2011.

Até a década de 90, espécies do gênero *Satanoperca* estavam alocadas no gênero *Geophagus* e dados cromossômicos afirmaram esta separação baseando-se na análise de duas espécies de *Satanoperca*, que possuíam um cariótipo mais derivado em relação ao gênero *Geophagus* (Kullander & Ferreira, 1988). Contudo, estudos que visem estabelecer

relações entre o genoma e sua organização cromossômica, são incipientes em espécies Amazônicas de ciclídeos, sendo de extrema valia na distinção dos táxons, bem como para a compreensão da evolução cariotípica dos grupos, sendo este o enfoque do presente trabalho, que caracterizou citogeneticamente, utilizando técnicas clássicas e moleculares, duas espécies de *Satanoperca* (*S. jurupari* e *S. lilith*) encontradas na região Amazônica Central.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foram analisados citogeneticamente duas espécies do gênero *Satanoperca* encontradas na Amazônia Central, sendo *S. jurupari* coletados no Lago Catalão, localizado na confluência do rio Negro e Solimões (água misturada, com características físico-químicas de água preta), e *S. lilith* coletados no Arquipélago de Anavilhanas localizado no rio Negro. As coletas foram realizadas com Licença Permanente do IBAMA (22984-1/2010) sendo que na ocasião os exemplares foram acondicionados em recipientes e encaminhados vivos ao Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram realizados todos os procedimentos necessários e as análises citogenéticas de cada indivíduo.

Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo dissolvido em água e posteriormente sacrificados para a retirada dos tecidos. Estes peixes foram numerados, registrados, fixados em formol 10% em 24h, lavados em água corrente e acondicionados em recipientes contendo álcool 70% visando seu depósito em Coleção de Peixes. E para a obtenção das preparações cromossômicas foi extraído o órgão hematopoiético de todos os indivíduos em estudo.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Após 24 horas da aplicação da solução de fermento, foi injetada, intraperitonealmente uma solução aquosa de colchicina a 0,0125% na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso do animal vivo, por 45 minutos (Bertollo *et al.*, 1978). Após esse tempo, os peixes foram submetidos a dose letal de óleo de cravo diluído em água, para posterior retirada da proporção anterior e/ou posterior do rim, que é o órgão hematopoiético.

Este foi lavado em KCl a 0,075M e transferido para outro recipiente de vidro contendo cerca de 10 mL da solução hipotônica e dissociado nesta solução com pinças.

A suspensão obtida foi colocada em estufa a 37 °C por 30 minutos. Após este tempo, o material foi ressuspendido cuidadosamente com o auxílio de uma seringa sem agulha e transferido para um tubo de centrifuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur. O fixador Carnoy foi preparado na proporção 3:1 (metanol: ácido acético) e 4 gotas foram adicionados à suspensão celular, que foi centrifugada durante 10 minutos a 900 rpm, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. Novamente o material foi ressuspendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 8 mL de fixador Carnoy foram adicionados e a suspensão foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 900 rpm, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e a eliminação do sobrenadante, 1,5 mL de fixador foram adicionados e o material ressuspendido com cuidado. Essa suspensão celular foi estocada em tubo de 1,5 mL e mantida em freezer para posterior utilização.

### 2.2.2 Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos

Para a preparação das lâminas com cromossomos mitóticos, as mesmas foram colocadas em solução sulfocrômica por 24 horas, após esse tempo as mesmas foram retiradas, lavadas em água corrente e água destilada para serem armazenadas em álcool 100%. Posteriormente as lâminas foram imersas em água destilada a 50 °C, em banho-maria. Após 5 minutos, as mesmas foram retiradas da água de forma a manter uma película de água sobre a sua superfície, na qual foi gotejada a suspensão celular em diferentes regiões e coradas com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 10 minutos.

### 2.2.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONS

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONS) foi utilizada a técnica descrita por Howell & Black (1980), que consiste em pingar sobre a preparação

cromossômica 2 gotas de uma solução coloidal, obtida com 1g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 50 mL de água destilada e acrescida de 0,5mL de ácido fórmico. Em seguida, foram adicionados sobre cada gota de solução coloidal 2 gotas de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (nitrato de Prata) a 50%, agitando levemente a lâmina, que foi coberta com uma lamínula. A lâmina foi colocada em câmara úmida, em banho-maria a 60 °C, por um período variável de 3 a 8 minutos, até atingir uma coloração marrom dourada, sendo então lavada em água destilada, permitindo que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água. As lâminas secaram diretamente ao ar, sendo posteriormente coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 1 minuto, lavadas em água corrente e secas novamente ao ar.

#### 2.2.4 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de banda C descrita por Sumner (1972), com algumas modificações.

As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram tratadas durante 2 minutos com HCl 0,2N a 46 °C, lavadas em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida, as preparações cromossômicas mitóticas foram incubadas a 46 °C, em solução de hidróxido de bário a 5%, recém-preparada e filtrada, por 1 minuto e 20 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo-se rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N, sendo posteriormente lavada em água destilada. Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M, pH 6,8), em banho-maria a 60 °C, por um período de 15 minutos, sendo posteriormente secas ao ar, coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 10 minutos, lavadas em água de corrente e secas ao ar.

## 2.2.5 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Para a hibridização fluorescente *in situ* foi utilizada a técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações.

### 2.2.5.1 Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado tecido muscular das duas espécies de *Satanoperca* seguindo o protocolo de Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. Para tanto, foi utilizado o tampão de lise (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, Urea 4 M, SDS 1%) de Estoup *et al.* (1993) e Asahida *et al.* (1996). Posteriormente foram acrescentados: 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 6 µL de RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas para que o tecido fosse totalmente digerido. A seguir foram feitas lavagens sucessivas com fenol, fenol clorofórmio, álcool isoamílico e clorofórmio hidratado (500 µL de cada um destes reagentes). Após a lise, o DNA foi separado das proteínas por precipitação salina juntamente com centrifugação a 14000 rpm. A fase aquosa (sobrenadante) que contém o DNA foi separada em um novo tubo e o DNA precipitado com volume de isopropanol 100% igual ao volume da fase aquosa obtida. Em seguida a amostra foi submetida à centrifugação, o sobrenadante descartado e o tubo contendo *pellet* de DNA colocado para secar. Ao final, o DNA foi hidratado com aproximadamente 100 µL de água milli-Q, dependendo da quantidade do *pellet* de DNA formado.

### 2.2.5.2 Obtenção das sondas via PCR e marcação por kit nick translation

Para a obtenção das sondas de DNAr 5S e DNAr 18S foi utilizado o DNA genômico extraído do músculo das duas espécies de *Satanoperca*, por amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Saiki *et al.*, 1988) utilizando os seguintes primers: DNAr 5S (A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Komiya & Takemura, 1979); DNAr 18S (IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT e IpR

5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.*, 2010). Para sequências teloméricas as ampliações foram feitas sem DNA com os seguintes *primers*: (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo *et al.* 1991).

As reações de PCR foram feitas em um termociclador Eppendorf - Mastercycler Gradient, para volume final de 15 µL (1 µL de DNA genômico (100 ng); 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM); 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl); 3,0 µL de dNTP (1 mM); 0,6 µL de cada primer (5 mM); água milli-Q para completar o volume).

As sondas isoladas foram marcadas pelo método de *nick translation* utilizando biotina 14-dATP (Bionick labeling system-Invitrogen) e/ou digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix Roche). Para tanto, em um tubo de eppendorf de 1,5 mL, mantido no gelo, foi preparada uma solução contendo 1 µL de Mix dNTP 10x; 1 µL de sonda de DNA (200 ng/µL); 1 µL de Mix de enzima 10x; 6 µL de água milli-Q, totalizando 9 µL, para cada lâmina hibridizada. Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 °C por 90 minutos no termociclador. Em seguida, para interromper a reação, foi adicionado 1 µL de stop buffer (EDTA 0,5 M) e após isso foi mantida em freezer.

### 2.2.5.3 Hibridização cromossômica

As sondas obtidas por PCR foram utilizadas para a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), conforme protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986).

### **Tratamento das lâminas**

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada. Em seguida foram tratadas com 90 µl de RNase 10 µg/mL (5 µL de RNase 10 mg/mL e 975 µL de 2XSSC) por 1 hora, em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas

três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS 1x durante 5 minutos.

### **Fixação**

As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente lavadas em PBS 1x por 5 minutos. Após, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada.

### **Pré-hibridização**

As lâminas foram desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada.

### **Solução de hibridização**

Para cada lâmina a ser hibridizada foi adicionado, em um tubo eppendorf, 6 µL da sonda, 15 µL de formamida (concentração final de 50%), 6 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final de 10%) e 3 µL (1/10) de 20xSSC (concentração final de 2xSSC), totalizando um volume de 30 µL.

### **Hibridização**

Foram colocados 30 µl de solução de hibridização sobre uma lamínula e invertendo a lâmina sobre a mesma. Sendo as lâminas mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (H<sub>2</sub>O destilada) a 37 °C por cerca de 14 horas.

### **Lavagens**

As lamínulas foram removidas das lâminas. Em seguida foram lavadas duas vezes em formamida 15% a 42°C durante 10 minutos cada. Em seguida, foi lavada novamente em solução Tween 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

## **Detecção**

As lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos. Após foram lavadas duas vezes com solução Tween 5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram colocadas sobre cada lâmina 50 µL de anti digoxigenina-rodamina e 30 µL de avidina-FITC 0,07% em tampão C (0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15 M de NaCl) ou 4 µL de FITC-Avidina conjugada 0,07% (Sigma) e 26 µL de Tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio pH 8,5 e 0,15M cloreto de sódio), Em seguida foram cobertas com lamínula e deixadas por 60 minutos em câmara úmida com água destilada. Posteriormente as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas três vezes em solução Tween 5% por 2 minutos a temperatura ambiente cada. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada e secas ao final.

## **Montagem das lâminas**

Foi adicionado a cada lâmina solução de DAPI diluído em *antifade* VectaShield Vector (20 µL de *antifade* e 1 µL de DAPI) ou iodeto de propídeo 0,2% diluído em *antifade* Vector (20 µL de *antifade* e 0,7 µL de iodeto de propídeo 50 µg/mL) e cobertos com lamínula para proceder à análise imediata.

### 2.2.6 Análise cariotípica

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio óptico foi estabelecido o número diploide modal e suas frequências relativas para cada indivíduo. As melhores metáfases obtidas com as técnicas clássicas (convencional, RON e banda C) foram fotografadas, com objetiva de imersão em câmera digital Canon Power shot A 650 IS. As metáfases submetidas a técnicas moleculares (FISH) foram analisadas e capturadas em um fotomicroscópio de epifluorescência Olympus Bx-51, em objetiva de imersão. Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS4, a partir

de cromossomos metafásicos mitóticos, os quais foram recortados e tentativamente emparelhados.

Os cromossomos foram medidos, utilizando o programa livre ImageJ e organizados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critérios de relação de braços ( $RB=BM/Bm$ , onde BM = braço maior e Bm = braço menor) segundo Levan *et al.* (1964). Devido à dificuldade de emparelhamento cromossômico nos ciclídeos na qual é peculiar, uma vez que estes apresentam tamanhos e morfologia cromossômica similar, os cromossomos serão agrupados segundo Thompson (1979), sendo consideradas duas categorias: meta-submetacêntricos e subtelo-acrocêntricos.

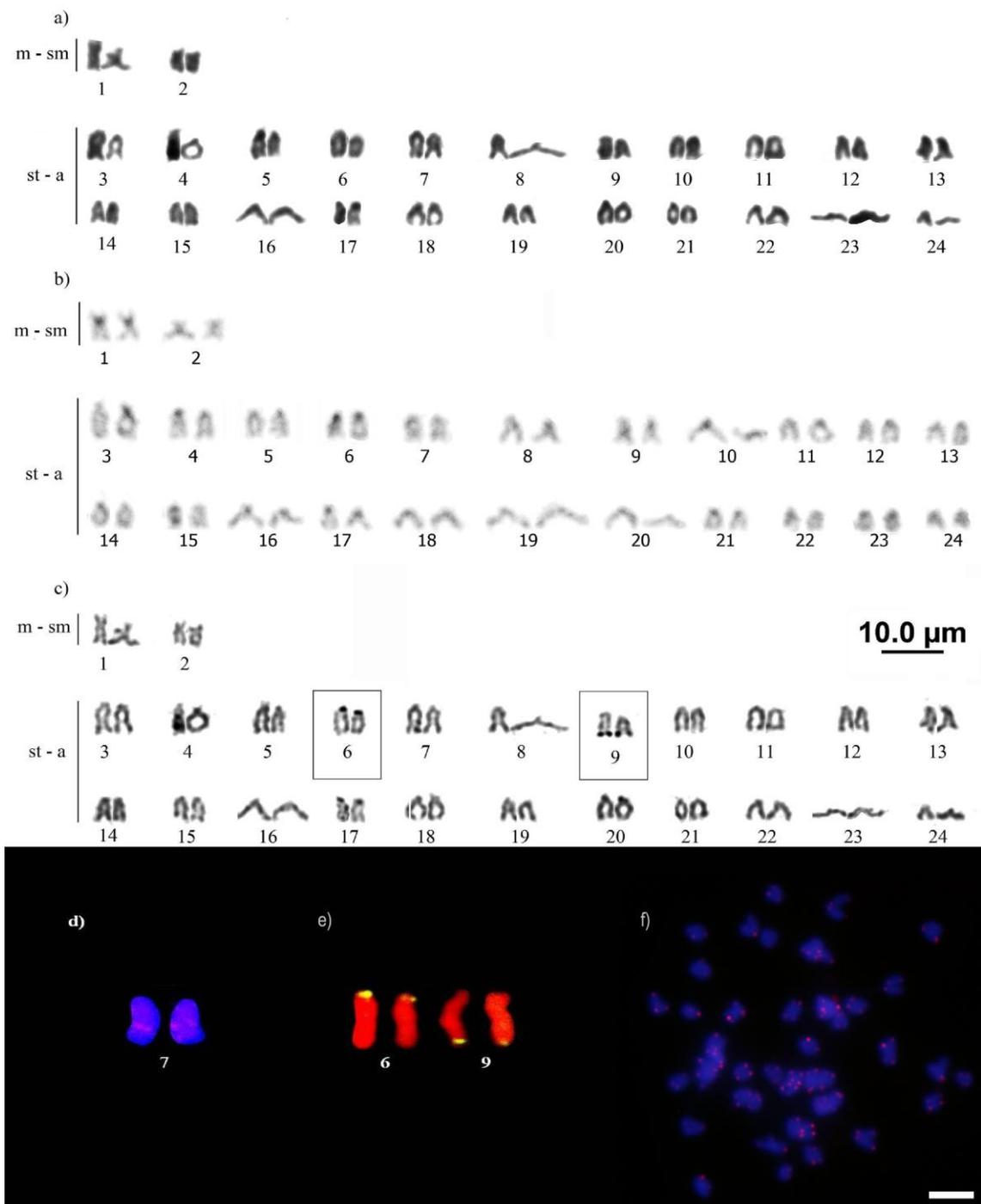
### 3. RESULTADOS

Foram analisados citogeneticamente 12 indivíduos de *Satanoperca jurupari* (8 ♂ e 4 ♀) e 6 indivíduos de *Satanoperca lilith* (4 ♂ e 2 ♀). Para *S. jurupari*, o número diplóide encontrado foi  $2n = 48$  cromossomos, sendo 4 m-sm + 44 st-a e o número fundamental (NF) igual a 52 (**Figura 2a**). A heterocromatina constitutiva apresentou-se distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos e na região terminal dos braços longos dos homólogos do par 15 (**Figura 2b**). Região organizadora do nucléolo múltipla foi observada por impregnação com nitrato de prata, localizadas nos braços curtos de ambos os homólogos do par 6 (st-a), sendo esta região positiva para a banda C, e nas regiões terminais de ambos os homólogos do par 9 (st-a) (**Figura 2c**). Entretanto, variação interindividual foi evidenciada, com 2 a 4 RONS ativas por metáfase mitótica. Sítios de DNA ribossomal 18S foram evidenciados no braço curto de ambos os homólogos do par 6 (st-a) e na região terminal de ambos os homólogos do par 9 (st-a), sendo observado um heteromorfismo no tamanho do local do DNAr 18S em uma metáfase de um indivíduo desta espécie devido a um *crossing-over* desigual durante a recombinação, enquanto que os sítios de DNA ribossomal 5S estão localizados nos homólogos do par 7 (**Figura 2d, e**). Sítios teloméricos intersticiais não foram evidenciados (**Figura 2f**).

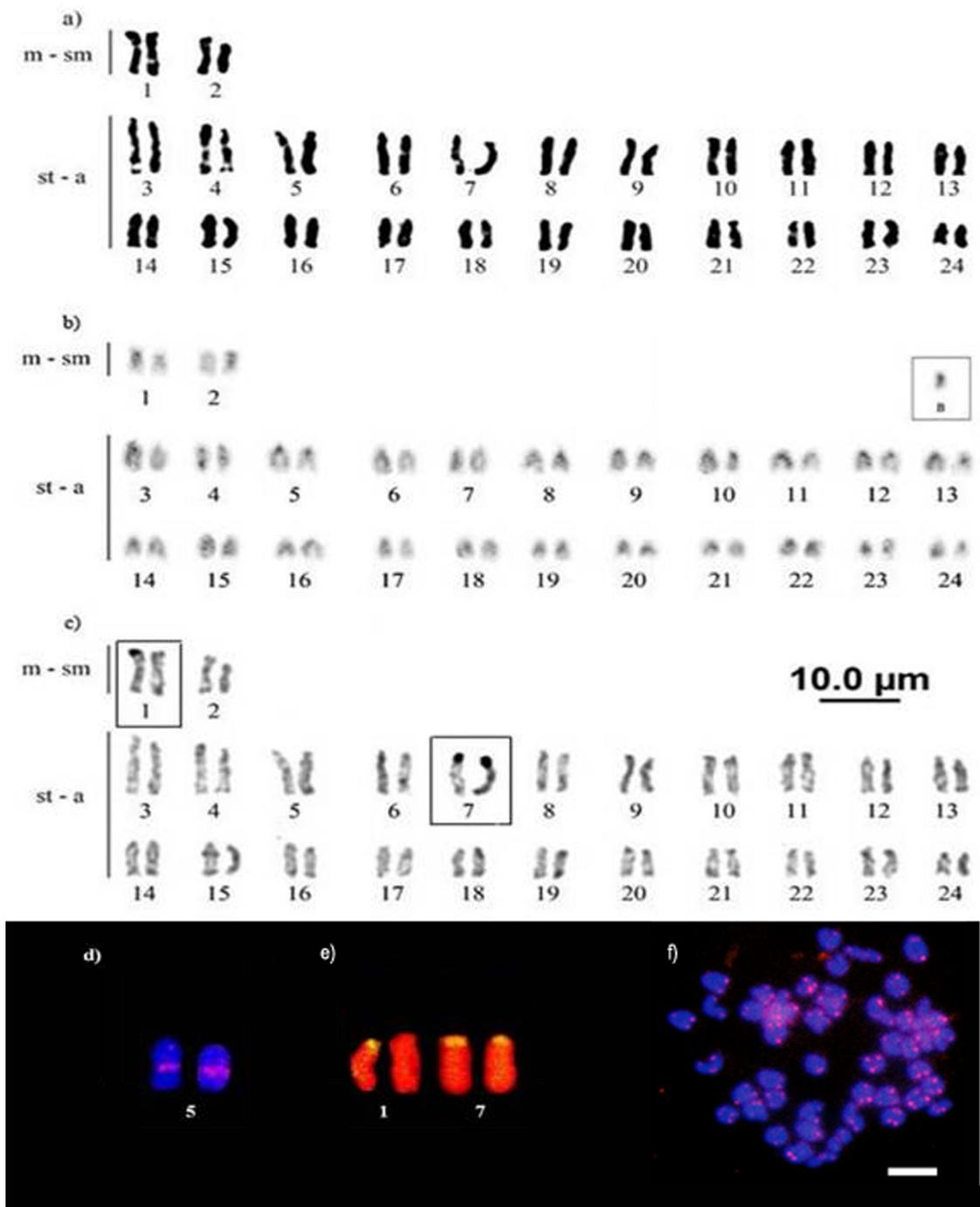
A espécie *Satanoperca lilith* também apresentou número diplóide de  $2n = 48$  cromossomos, sendo representado por sua fórmula cariotípica igual a 4 m-sm + 44 st-a e número fundamental (NF) igual a 52 (**Figura 3a**). Contudo, presença de um cromossomo supranumerário foi revelado em algumas metáfases de um indivíduo desta espécie. A heterocromatina constitutiva apresentou-se tênue e distribuída nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, sendo que o cromossomo supranumerário é totalmente heterocromático (**Figura 3b**). Quanto à região organizadora de nucléolo, a impregnação com nitrato de prata

revelou RON múltipla, com marcações na região terminal de um dos homólogos do par 1 (m-sm) e na região do braço curto de ambos os homólogos do par 7 (st-a) (**Figura 3c**). Sítios ribossomais 18S foram evidenciados na região terminal de um dos homólogos do par 1 (m-sm) e no braço curto de ambos os homólogos do par 6 (st-a), enquanto que os sítios de DNA ribossomal 5S estão localizados nos homólogos do par 5 (**Figura 3d,e**). Sítios teloméricos intersticiais não foram evidenciados (**Figura 3f**).

Para ambas as espécies, não foi observado nenhum sistema cromossômico de determinação de sexo, ou seja, machos e fêmeas apresentaram a mesma composição cariotípica.



**Figura 2** – Cariótipo da espécie *S. jurupari*. a) Coloração convencional com Giemsa; b) Distribuição da heterocromatina constitutiva revelada pelo tratamento com hidróxido de bário (banda C); c) Impregnação com Nitrato de Prata sequencial evidenciando em destaque os pares cromossômicos portador da RON; d) Sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos); e) sítios de DNAr 18S (sinais amarelos); f) Ausência de sítios teloméricos intersticiais (sítios teloméricos em vermelho). Barra: 10 µm.



**Figura 3** – Cariótipo da espécie *S. lilith* a) Coloração convencional com Giemsa; b) Distribuição da heterocromatina constitutiva revelada pelo tratamento com hidróxido de bário (banda C); c) Impregnação com Nitrato de Prata sequencial evidenciando em destaque os pares cromossômicos portador da RON; d) Sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos); e) sítios de DNAr 18S (sinais amarelos); f) Ausência de sítios teloméricos intersticiais (sítios teloméricos em vermelho). Barra: 10  $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSÃO

Apesar dos peixes da família Cichlidae serem os mais estudados citogeneticamente dentro da ordem Perciformes, apenas 25% das espécies deste grupo são conhecidas cariotipicamente (Oliveira *et al.*, 2007) e, destas, aproximadamente 60% apresenta número diplóide igual a 48 cromossomos, sendo a maioria do tipo acrocêntrico (Feldberg *et al.*, 2003).

Para os ciclídeos do gênero *Satanoperca*, as características cariotípicas são conhecidas apenas para *S. papaterra* e *S. jurupari*, sendo os primeiros provenientes da bacia do rio Paraná (Paraná) e os últimos do rio Araguaia (Mato Grosso). Ambas as espécies apresentaram número diplóide igual a 48 cromossomos e ausência de cromossomos sexuais diferenciados, porém *S. papaterra* possui  $2n = 6$  meta-submetacêntricos (m-sm) + 42 subtelo-acrocêntricos (st) e a região organizadora de nucléolo (RON) presente no primeiro par do grupo m-sm (Martins *et al.*, 1995), enquanto que *S. jurupari* possui  $2n = 4$  m-sm + 44 st-a e sítios ribossomais envolvidos com a RON em dois cromossomos do tipo (st-a) (Poletto *et al.*, 2010).

No presente estudo, foi verificado que as espécies *S. jurupari* e *S. lilith* apresentaram o mesmo número diplóide que a maioria dos ciclídeos já analisados ( $2n = 48$  cromossomos). *Satanoperca lilith*, cujo cariótipo ainda não havia sido descrito, revelou  $2n = 4$  m-sm + 44 st-a, ocorrendo à presença de um cromossomo B totalmente heterocromático em algumas metáfases de um indivíduo desta espécie. Contudo a sua origem e função deste cromossomo supranumerário permanecem obscuros, não sendo possível estabelecer se ele se originou de um fragmento de um cromossomo do complemento. Cromossomos supranumerários já foram relatados para a espécie *S. jurupari* (Oliveira *et al.*, 2009), porém nenhum cromossomo B foi evidenciado nos indivíduos analisados pertencentes a esta espécie provenientes da Amazônia, apesar da fórmula cariotípica ser semelhante à encontrada na maioria dos indivíduos do rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil ( $2n = 4m-sm + 44$  st-a) (Poletto *et al.*, 2010).

Apesar da mesma fórmula cariotípica, rearranjos cromossômicos ocorreram na evolução do grupo *Satanoperca*, porém os mesmos não foram revelados por sítios teloméricos intersticiais, provavelmente porque estas sequências, quando estão internamente, estão livres de pressão seletiva, podem sofrer mutações e originar novas classes de DNA repetitivos, os quais podem ficar alocados ou não em regiões heterocromáticas (Mandrioli *et al.*, 1999; DeBaryshe & Pardue, 2011). Contudo, a presença de rearranjos cromossômicos em *Satanoperca* é evidente ao comparar-se os dados relacionados ao número e posição de sítios ribossomais 18S, que em *S. jurupari* do rio Araguaia (MT) localizam-se em apenas um par de cromossomos acrocêntricos (Poletto *et al.*, 2010), enquanto que ambas as espécies amazônicas analisadas no presente trabalho apresentam dois pares de cromossomos portadores de sítios ribossomais DNAr 18S. Esta divergência nos dados pode estar relacionada à dinâmica natural de nascimento e morte de sequências repetitivas de DNA em populações isoladas (Roney & Ward, 2005), sendo que algumas destas sequências poderiam perder a viabilidade. Contudo, apesar dos dois pares cromossômicos envolvidos com a RON serem distintos entre *S. lillith* e *S. jurupari* da Amazônia, todos os sítios são funcionais, apesar de haver variação intraespecífica verificada com a impregnação por nitrato de prata, fato que é comum para peixes devido a atividade diferencial destas regiões em função de respostas ambientais (Galetti & Martins, 2004).

Além disso, estes dados mostram que *S. lillith* apresentou um sítio ribossomal 18S no maior par cromossômico do complemento e sítio adicional nos homólogos do par 7, enquanto que em *S. jurupari* o DNAr 18S apresentou-se localizado nos pares 6 e 9. A presença de região organizadora de nucléolo do tipo simples e estando presente no maior par cromossômico do complemento é considerada característica basal para os ciclídeos (Feldberg *et al.*, 2003), porém as espécies de *Geophagus*, grupo considerado irmão de *Satanoperca*,

apresenta sítios de DNAr 18S simples e localizados na região terminal do 6 par (Vicari *et al.*, 2006).

Diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva também foram observados para ambas as espécies, sendo que *S. jurupari* apresentou blocos mais conspícuos e marcação telomérica no par 15 sendo este cromossomo considerado um marcador espécie-específico, tais características também foram observadas em outras espécies de Cichlidae (Feldberg *et al.*, 2003) enquanto *S. liliith* apresentou marcações tênues e nas regiões pericentroméricas. Sendo assim, ambas as espécies apresentaram dados basais, uma vez que para Cichlidae os blocos de heterocromatina são evidenciados na região pericentroméricas de todos os cromossomos (Thompson, 1979; Kornfield, 1984; Feldberg & Bertollo, 1985; Brum & Galetti Jr., 1997; Feldberg *et al.*, 2003). A heterocromatina é atualmente reconhecida como uma parte importante do genoma dos eucariotos (Grewal & Jia, 2007; Skipper, 2007; Bühler, 2009). Devido à natureza repetitiva dos DNAs ribossomais e de outras sequências encontradas na heterocromatina constitutiva, erros da DNA polimerase na adição de nucleotídeos durante a duplicação do material genético e *crossing-over* desigual, podem ocasionar acúmulo de DNAr (Pendás *et al.*, 1993). Podendo assim, explicar o heteromorfismo observado em uma metáfase de *S. jurupari* no sítio ribossomal 18S o que sugere duplicação destas sequências e/ou *crossing-over* desigual, como já foi proposto para outros peixes e mamíferos (Ashley & Ward, 1993; Salvadori *et al.*, 1995; Boron *et al.*, 2006).

Com relação à utilização das sondas de DNAr 5S, entre os Perciformes existem poucos estudos sobre localização e número de locos desse gene (Vicari *et al.*, 2006), não havendo dados até então para ambas as espécies. Os sítios de DNAr 5S foi localizado na região intersticial de um par de cromossomos homólogos de ambas as espécies, sendo no par 7 para *S. jurupari* e no par 5 para *S. liliith*, ambos distintos da localização do DNAr 18S. A ausência de sintenia é a condição mais frequente para peixes, provavelmente porque os genes

da família 45S são transcritos pela RNA polimerase I, enquanto que os genes 5S são transcritos pela RNA polimerase III (Martins, 2007). Ausência de sintenia também é encontrada para *Geophagus brasiliensis*, que apresenta o DNAr 5S na região intersticial dos homólogos do par 10, enquanto que o DNAr 18S está localizado terminalmente nos homólogos do par 6. A conservação do padrão de distribuição do DNAr 5S geralmente em posição intersticial nos cromossomos de Cichlidae, pode estar relacionada com uma proteção para que eventos de dispersão desse gene pelo genoma não ocorram e que tal padrão de localização cromossômica parece corresponder a uma condição ancestral (Martins & Wasko, 2004)

De modo geral, estes dados mostram que *Satanoperca* apresenta características cromossômicas que permitem a sua distinção de *Geophagus* e corroboram a sua posição derivada nas árvores filogenéticas propostas por Kullander & Ferreira (1988), uma vez que os *Geophagus* apresentam características cromossômicas basais, tais como sítios de DNAr 18S na região terminal do braço curto de apenas um par de homólogos. Ainda, estes dados revelam que *Satanoperca* não trata-se de um grupo com estabilidade na organização cariotípica, apresentando características cromossômicas distintas para cada espécie, havendo presença de rearranjos cromossômicos na evolução cariotípica para as espécies do gênero.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asahida, T.; Kobayashi, T.; Saitoh, K.; Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science*, 62 (5): 727-730.
- Ashley T, Ward DC (1993) a hot spot of recombination coincides with interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. *Cytogenet Cell Genet* 62:169–171.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Boron A, Ozouf-Costaz C, Coutanceau JP, Woroniecka K (2006) Gene mapping of 28S and 5S rDNA sites in the spined loach *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from a diploid population and a diploid–tetraploid population. *Genetica* 128:71–79. doi: 10.1007/s10709-005-5536-8.
- Brum M.J.I & Galetti JR P.M. (1997). Teleostei Ground Plan Karyotype. *J. Comp. Biol.*, 2: 91–102.
- Bühler M. (2009). RNA turnover and chromatin-dependent gene silencing. *Chromosoma* 118:141–151. doi: 10.1007/s00412-008-0195-z.
- DeBaryshe P.G., Pardue M.L. (2011). Differential maintenance of DNA sequences in telomeric and centromeric heterochromatin. *Genetics*, 187: 51-60. doi:10.1534/genetics.110.122994
- Estoup, A.; Presa, P.; Krieg, F.; Vaiman, D.; Guyomard, R. 1993. (CT) and (GT) n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71: 488-496.

- Farias, I.P.; Orti, G.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Meyer, A. 2000. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. *J Mol Evol*, 48:703-711.
- Feldberg E. & Bertollo L.A.C. (1985). Karyotypes of 10 Species of Neotropical Cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38: 257-68.
- 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. (Eds). Fish adaptation*. Science Publishers, New Hampshire, EUA. p. 285-308.
- Galetti Jr., P.M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridização *in situ* para conhecimento dos cromossomos de peixes. *In: Guerra, M. (Org) FISH: Conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil. p. 61-88.
- Grewal SIS, Jia, S (2007) Heterochromatin revised. *Nat Rev Genet* 8:35–46. doi:10.1038/nrg2008.
- 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 Fish Biology*, 76: 1117–1127
- Heckel, J. 1840. Johan Natterer's neue Flussfische Brasilien's nach den Beobachtungen und Mittheilungen des Entdeckers beschrieben. *Ann Wien von Mus Naturg*, 2: 327-470.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1- step method. *Experientia*, 36: 1014–1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780.

- Kocher, T.D. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Rev Genet*, 5: 288-98.
- Komiya, H.; Takemura, S. 1979. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*, 86: 1067-1080.
- Kornfield, I. L., 1978. Evidence for rapid speciation in cichlid fishes. *Experientia*, 34: 335-336.
- Kornfield, I.L.; Rittle, U.; Richler, C.; Warhman, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the Sea of Galelee. *Evolution*, 33: 1-14.
- Kornfield IL (1984) Descriptive Genetics of Cichlid fishes. In: Turner BJ (ed). Evolutionary Genetics of Fishes. Plenum Press, New York. pp 591-616.
- Kullander, S.O. 1998. A phylogeny and classification of the South America Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 461-498.
- Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 605-654.
- Kullander, S.O.; Ferreira, E.J.G. 1988. A new *Satanoperca* species (Teleostei, Cichlidae) from the Amazon River Basin in Brazil. *Cybium*, 12 (4): 343-355.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Liem, K.F. 1974. Evolutionary strategies and morphological innovations: Cichlid pharyngeal jaws. *Syst. Zool.*, 22: 425-441.

- Lowe-McConnell, R.H. 1969. The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behaviour. *Zool. J. Linn. Soc.*, 48: 255-302.
- Mandrioli M., Cuoghi B.C., Marini M., Manicardi G.C. (1999). Localization of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan) (Osteichthyes). *Caryologia* 52(3-4):155-157
- Martins-Santos I.C., Portela-Castro A.L.B., Julio Jr. H.F. 1995. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia*, 60: 223-231.
- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S 468 Ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (Ed). Focus on Genome Research. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, pp 335-363.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, New Hampshire, EUA. p. 421-453.
- Nelson J.S. (2006). *Fishes of the World*. New York, John Wiley & Sons.
- Oliveira C.; Foresti F.; Almeida-Toledo L.F. (2007). Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F & Kapoor B. G (Eds). *Fish Cytogenetics*. Enfield, Science Publisher.
- Oliveira, C.; Foresti, F.; Hilsdorf, A.W.S. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35: 81-100.
- Pendás A.M.; Morán P.; Garcia-Vásquez E. (1993). Ribosomal RNA Genes are Intersped Throughout a Heterochromatin Chromosome Arm in Atlantic Salmon. *Cytogenetic Cell Genetics*, 63: 128-130.

- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934-2938.
- Poletto, A.B.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Melo, D.; Nakagima, R.T.; Mazzuchelli, J.; Ribeiro, H.; Venere, P.C.; Nirchio, M.; Kocher, T.; Martins, C. 2010. Chromosome differentiation pattern during cichlid fish evolution. *Genetics*, 11:50
- Rooney AP, Ward TJ (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci.*102:5084–5089. doi:10.1073/pnas.0409689102.
- 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.
- Salvadori, S., Deiana, A.M.; Coluccia, E.; Floridia, G.; Rossi, E.; Zuffardi, O. 1995. Co-localization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, 3: 54–58.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA. p. 633–664.
- Skipper, M. 2007. Mysteries of heterochromatic sequences unravelled. *Nature Reviews*, 8: 567.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 74: 304-306.
- Thompson, K.W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*, 4: 679-691.

Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006) Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia* 59:260-266.