

Caracterização cariotípica de um estoque de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da Universidade Estadual de Londrina, mediante diversas técnicas de bandamento cromossômico

Karyotypical characterization from stock of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at Londrina State University, PR, Brazil, through several techniques of chromosomes band

Creusa Maria Rodrigues Leonhardt¹; Lucia Giuliano Caetano²; Alberto Fenocchio³; Mauro Caetano Filho⁴; Julio Hermann Leonhardt^{5*}

Resumo

Foram analisados citogeneticamente 14 indivíduos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* que fazem parte do estoque de reposição de reprodutores da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Todos os indivíduos apresentaram o mesmo número diplóide de 44 cromossomos. As NORs foram observadas em quatro cromossomos com marcações em posição terminal do braço curto e a hibridação “in situ” (FISH) com sonda de 18S também evidenciou a presença de dois pares de cromossomos contendo cístrons ribossômicos. O tratamento com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente, não mostrou bandas brilhantes em nenhum cromossomo do complemento. A Banda C (CBG) evidenciou, regiões de heterocromatina distribuídas em vários cromossomos nas regiões centroméricas, sendo observadas algumas marcações em regiões teloméricas, principalmente no maior par de cromossomos do complemento, um par apresentou-se quase totalmente heterocromático. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados disponíveis na literatura, porém, quando analisadas as bandas C e as NORs, foram evidenciadas algumas diferenças que aparentemente caracterizam a população local de peixes da Universidade Estadual de Londrina.

Palavras-chave: Citogenética, *Oreochromis niloticus*, NORs, CMA₃, DAPI, heterocromatina

¹ Bióloga formada pela Universidade Estadual de Londrina. Foi colaboradora do Projeto CPG 03665 intitulado: “Técnicas para obtenção de machos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, geneticamente modificadas”. E-mail: leonhard@uel.br.

² Depto. de Biologia Geral CCB/ UEL, Londrina, PR.

³ Depto. de Genética, Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

⁴ Depto. de Biologia Animal e Vegetal CCB/ UEL, Londrina, PR.

⁵ Depto. de Ciências Fisiológicas, CCB/ UEL, Londrina, PR. E-mail: leonhard@uel.br

* Autor para correspondência.

Abstract

14 specimens of Nile's tilapia were analyzed cytogenetically, *Oreochromis niloticus*, that belong to the stock of fish breeding from the Freshwater Aquaculture Station of the Londrina State University in the Paraná, Brazil. All specimens presented the same dispoloid number of 44 chromosomes. The NORs were observed in four chromosomes with marks in terminal position of the short arm and the hybridization "in situ" (FISH) with probe of 18 S also evidenced the presence of two pairs of chromosomes containing ribbosomic cistrons. The treatment with the fluochromes CMA3 and DAPI, respectively, didn't show shinning bands in any chromosome of the complement. The band C (CBG) evidenced regions of heterochromatin distributed on several chromosomes in the centromeric regions, being observed some marks in telomeric regions, mainly on the biggest pair of chromosomes of the complement, a pair presented itself almost totally heterochromatic. The obtained results are in accordance with the data found in literature, nevertheless when the C bands and NORs were analyzed, were evidenced some differences that apparently characterized the local fish population of the Londrina State University.

Key words: Cytogenetics, *Oreochromis niloticus*, NORs, CMA3, DAPI, fish, heterochromatin

Introdução

Tilápia é um nome comum utilizado para denominar um grande numero de espécies de ciclídeos (Perciformes), provenientes da África, pertencentes ao grupo Tilapiine, divididos em 3 gêneros: *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, sendo este último de grande importância na aqüicultura mundial (MC ANDREW, 2000).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* vem destacando-se por apresentar inúmeras qualidades zootécnicas, como rusticidade, crescimento rápido, grande adaptação alimentar, boa conversão alimentar e ganho de peso. Além disso, apresenta uma carne branca, de excelente paladar e textura, com espinhos ausentes na musculatura lateral, facilitando a técnica de filetagem e a industrialização da carcaça (ZANONI; FILHO; LEONHARDT, 2000; BOSCOLO et al., 2001; VIEIRA, 2005).

A produção da piscicultura brasileira representa menos de 10 % da produção da pesca brasileira, que gira em torno de 700 mil toneladas/ano, enquanto o consumo nacional está próximo de um milhão de toneladas/ano. Para aumentar a produção e atender esta demanda crescente, é preciso desenvolver linhagens melhoradas. Uma alternativa de melhoramento genético é o uso da seleção. Um requisito inicial para aplicação da seleção em tilápias é a existência da variabilidade genética das

populações. Uma segunda etapa envolve a identificação das famílias e as características fenotípicas desejadas (BENTSEN; EKNATH; PALADA-DEVERA, 1998; VIEIRA, 2005).

Os progressos no melhoramento genético de peixes cultivados têm sido foco de discussões e revisões durante a última década (HULATA, 2001). Os objetivos têm visado aumentar a produção de novas linhagens, com o desenvolvimento de tecnologias modernas, incluindo manipulação sexual e cromossômica, a criopreservação de gametas, a obtenção de indivíduos transgênicos e o mapeamento genômico. Os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e estão sendo atualmente incorporados à aqüicultura de forma prática e eficiente (MARTINS et al., 2002).

Muitos estudos genéticos têm sido realizados com o objetivo de identificar as relações filogenéticas dos ciclídeos. Estes estudos associados a pesquisas de hibridação de espécies e de reversão sexual têm sido utilizados para um melhor entendimento dos mecanismos de determinação de sexo em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, bem como em outras espécies do grupo (MAIR et al, 1997; TUAN; LITTLE; MAIR, 1998; ABUCAY et al, 1999).

Oreochromis niloticus bem como *O. aureus* apresentam sistema de determinação sexual de tipo XX/XY, demonstrado através da análise do complexo

sinaptonêmico (FORESTI et al, 1993; CARRASCO; PENMAN; BROMAGE, 1999), neste caso o primeiro par cromossômico seria o responsável pela determinação do sexo, apesar de não haver uma diferenciação morfológica notável entre os membros desse par, o que dificulta sua distinção em preparações cromossômicas mitóticas.

O presente trabalho teve como objetivo analisar citogeneticamente os cromossomos de *Oreochromis niloticus* de um estoque de reprodutores proveniente da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil), por meio de diferentes técnicas de coloração (AgNOR, FISH com sondas de rDNA 18S, CMA₃, DAPI e Banda C).

Material e Métodos

Foram analisados 14 exemplares de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (06 fêmeas e 08 machos) mantidos em cativeiro com finalidade de reprodução na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), Paraná, Brasil.

Os exemplares utilizados foram provenientes de uma linhagem da tilápia do Nilo popularmente intitulada “local” ou “nilótica”, cultivada na Região Sul do país e que tiveram origem na primeira importação oficial de tilápia do Nilo em 1971. Esta linhagem é também chamada de Bouaké (BOKE) por Vieira (2005) e Lupchinski et al. (2006), sendo originária da Costa do Marfim, região Oeste da África. Os animais apresentavam-se em plena reprodução e as fêmeas com peso aproximado de 300 gramas e os machos com peso em torno de 900 gramas.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos através da técnica de cultura de linfócitos descrita por Fenocchio e Bertollo (1988), evitando o sacrifício dos peixes estudados. A caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foi realizada

conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980). A técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH), utilizando sonda de DNA r 18S, (cedida pelo Laboratório de Genética e Citogenética de Peixes da UNESP-Botucatu), foi realizada de acordo com o método descrito por Swarça et al. (2001). A heterocromatina foi detectada utilizando a técnica convencional de bandas C (CBG), descrita por Sumner (1972) e o tratamento com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI, seguiu a técnica descrita por Schmid (1980).

Resultados e Discussão

Os exemplares de *Oreochromis niloticus* apresentaram número diplóide igual a 44 cromossomos, tanto para machos como para fêmeas (Figura 1a), corroborando com os dados disponíveis para essa espécie (MAJUMDAR; MC ANDREW, 1986; OLIVEIRA; WRIGHT, 1997; TORRES; LEÃO, 2002, MARTINS et al, 2004). Em *Oreochromis niloticus* foi descrito um sistema de determinação sexual de tipo XX/XY, o qual em alguns casos pode ser evidenciado através da análise do complexo sinaptonêmico por Foresti et al (1993) e Carrasco, Penman e Bromage (1999), não sendo possível sua diferenciação somente através da análise dos cromossomos mitóticos, onde podemos algumas vezes observar uma sutil diferença de tamanho entre os cromossomos do primeiro par (Figura 1a).

Por meio da impregnação pelo nitrato de prata (AgNO₃), foram evidenciados até quatro cromossomos com marcações em posição terminal do braço curto (Figura 1b). Torres e Leão (2002) em concordância com estes dados, descreveram as AgNORs de um estoque de tilápias do Nilo em dois pares de cromossomos, já Martins et al (2004), tem observado a ocorrência de três pares de cromossomos portadores de NORs.

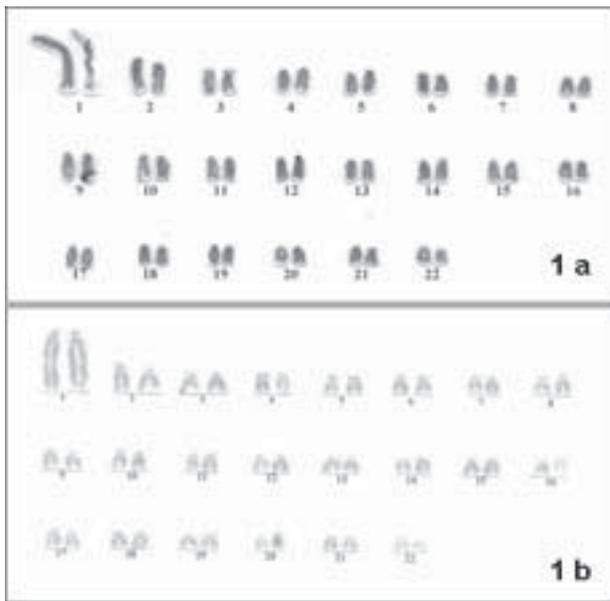


Figura 1. Cariótipo da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* $2n = 44$ de um estoque de peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina.

1a) Técnica de Giemsa

1b) Técnica de impregnação pelo nitrato de prata (AgNOR).

Estes dados não são concordantes e isto pode ser devido ao fato da coloração com nitrato de prata, nem sempre revelar com precisão o número de cromossomos portadores de NORs, uma vez que o AgNO_3 reage somente com proteínas ácidas associadas com DNAr que esteve ativo na interfase anterior (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VÁSQUEZ, 1993). Porém, Martins et al (2004) confirmaram a ocorrência dos três pares evidenciados pela prata mediante a utilização de hibridação *in situ* com sondas de DNAr 18S. Isto não foi constatado no estoque analisado no presente trabalho, no qual foram aplicadas as mesmas sondas, obtendo-se somente marcações em dois pares de cromossomos (Figura 2a). Este fato indica que essa diferença pode ser devida às características citogenéticas próprias de cada um dos estoques analisados, e não simplesmente atribuídas a problemas técnicos na detecção dos cromossomos portadores da NOR.

O tratamento com os fluorocromos CMA_3 e DAPI, que evidencia regiões ricas em GC e AT, respectivamente, não mostrou bandas brilhantes em

nenhum cromossomo do complemento (Figura 2b, 2c). Esta observação é interessante visto que as NORs estão normalmente associadas com famílias de DNA repetitivo, freqüentemente rico em seqüências GC em muitas espécies de peixes (SALVADORI et al, 1995).

A técnica de Banda C permitiu identificar regiões de heterocromatina distribuídas nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos, sendo observadas algumas marcações em regiões teloméricas, principalmente no maior par de cromossomos do complemento. Um par de cromossomos apresentou-se quase totalmente heterocromático (Figura 2d). Heterocromatina localizada em posição centromérica é a situação mais freqüente em várias populações de *Oreochromis niloticus* estudadas por diversos autores (OLIVEIRA; WRIGHT, 1997), entretanto esse padrão não é idêntico, uma vez que em alguns grupos ocorrem marcações intersticiais (MAJUMDAR; MC ANDREW, 1986), indicando que estas diferenças podem estar relacionadas com processos evolutivos que foram fixando diversas características em distintas populações.

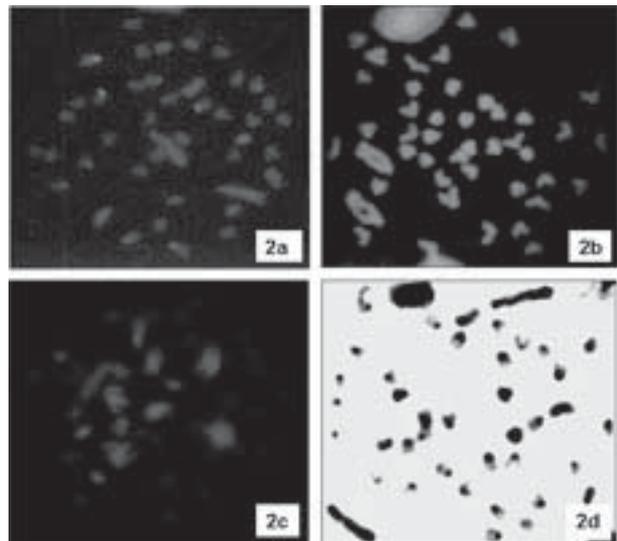


Figura 2. Metáfase da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* de um estoque de peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina.

2a) Técnica de FISH com sonda de DNAr 18 S

2b) Tratamento com fluorocromo CMA_3

2c) Tratamento com fluorocromo DAPI

2d) Técnica da Banda C com regiões de heterocromatina.

Os resultados obtidos mostram que o estoque analisado apresenta a macroestrutura (número e morfologia cromossômica) conservada, coincidindo as observações realizadas, com os dados disponíveis na literatura, porém, quando analisadas as bandas C e as NORs, foram evidenciadas algumas diferenças que caracterizam a população local que devem ser atribuídas aos estoques de origem.

Referências

- ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus*, L. *Aquaculture*, Amsterdam, v.173, p.219-234, 1999.
- BENTSEN, H. B.; EKNATH, A. E.; PALADA-DE VERA, M. S. Genetics improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. Amsterdam, v.60, p.145-173, 1998.
- BOSCOLLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaças de machos revertidos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, linhagem tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.30, n.5, p.1391-1396, 2001.
- CARRASCO, L. A. P.; PENMAN, D. J.; BROMAGE, N. Evidences for the presence of Sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*, Amsterdam, v.173, p.207-218, 1999.
- FENOCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.847-852, 1988.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GALETTI, P. M.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, Ottawa, v.36, p.1124-1128, 1993.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, Basel, v.36, p.1014-1015, 1980.
- HULATA, G. Genetics manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, Ribeirão Preto, v.111, p.155-173, 2001.
- LUPCHINSKI, E.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; GASPARINO, E.; GOMES, P. C.; BLANCK, D. V. Aplicação de RAPD para avaliação genética de três linhagens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. In: AQUACIÊNCIA, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: FURG, 2006.
- MAIR, G. C.; ABUCAY, J. S.; SKIBINSKI, D. O. F.; ABELHA, T. A.; BEARDMORE, J. A. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, Ottawa, v.54, p.396-404, 1997.
- MAJUMDAR, K. C.; MC ANDREW, B. J. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, Tilapia, Sarotherodon, and Oreochromis of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica*, Dordrecht, v.68, p.175-188, 1986.
- MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; WASKO, A. P.; WRIGHT, J. M. Physical mapping of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes – a review. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 231, p.37-49, 2004.
- MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F. P.; WASKO, A. P.; LEITÃO, G. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.5, n.28, set-out, p.12-15, 2002.
- MC ANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationship and biogeography. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MC ANDREW, B. J. *Tilapias: Biology and Exploitation*. Kluwer: Boston: Academic Publishers, 2000. cap.1, p.1-3.
- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Molecular Cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus*. (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, Oxford, v.6, p.205-211, 1997.
- PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin in Brown Trout. *Chromosome Research*, Oxford, v.1, p.63-67, 1993.
- SALVADORI, S.; DEINA, A. M.; COLOCCIA, E.; ROSSI, E.; ZUFARDI, O. Localization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic cels. *Chromosome Research*, Oxford, v.3, p.54-58, 1995.
- SCHIMID, M. Chromosome banding in amphibia. IV Differentiation of GC and AT rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, Berlin, v.77, p.83-103, 1980.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, New York, v.74, p.304-306, 1972.

SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; VANZELA, A. L. L.; DIAS, A. L. Polimorphism of RNA genes in *Pirirampus pirinampu*. (pisces: Pimelodidae) detected by in situ hybridization. *Cytologia*, Tokyo, v.66, p.275-278, 2001.

TORRES, A. R.; LEÃO, A. G. Chromosomal analysis in a fish stock of Tilapia (Pisces: Perciformes: Cichlidae). *Estudos de Biologia*, Curitiba, v.24, n.49, p.39-42, 2002.

TUAN, P. A.; LITTLE, D. C.; MAIR, G. C. Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquaculture*, Amsterdam, v.159, p.293-302, 1998.

VIEIRA, V. P. Avaliação do desempenho produtivo e da variabilidade genética de linhagens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, com o uso do marcador de RAPD. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá.

ZANONI, M. A.; FILHO, M. C.; LEONHARDT, J. H. Performance de crescimento de diferentes linhagens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), em gaiolas. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.22, n.3, p.683-687, 2000.