



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE REALEZA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA**

DENISE FELICETTI

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO RIO CAPANEMA, REALEZA, PARANÁ**

**REALEZA
2015**

DENISE FELICETTI

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO RIO CAPANEMA, REALEZA, PARANÁ**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao corpo docente da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientação: Ms. Luciana Borowski Pietricoski.

**REALEZA
2015**

ANÁLISE CROMOSSÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO RIO CAPANEMA, REALEZA, PARANÁ

Denise Felicetti¹

Luciana Borowski Pietricoski²

RESUMO

O grupo *Hoplias malabaricus* apresenta grande variedade cariotípica, representando um complexo de espécies, se caracterizando por ter sete cariomorfos claramente identificados com base no número diploide, morfologia cromossômica e cromossomos sexuais. Este trabalho propôs analisar através de técnicas citogenéticas populações naturais de *H. malabaricus* presentes no Rio Capanema, região sudoeste do Paraná, pertencente a trecho do baixo rio Iguaçu. As fêmeas apresentaram número diploide de 40 cromossomos (14m + 26sm) e os machos 39 cromossomos (14m + 25sm), pertencente ao cariomorfo D, o qual apresenta sistema de cromossomo sexual (X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y). O bandamento C demonstrou a presença de heterocromatina nas regiões centroméricas e pericentroméricas em grande parte dos cromossomos. Este trabalho apresenta o primeiro relato do cariomorfo D de *H. malabaricus* na bacia do Rio Iguaçu, sendo este relato no último trecho de seu curso.

Palavras-chave: Citogenética de Peixes. Evolução Cromossômica. Complexo de espécies.

ABSTRACT

Analysis chromosomal in *H. malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) in the River Capanema, Realeza , PARANÁ. The *H. malabaricus* group presents a wide variety karyotype, representing a complex of species and it is characterized for have seven karyomorphs clearly identified based in the diploid number, chromosome morphology and chromosomes sex.

1. Denise Felicetti, Acadêmica da 10ª fase do curso de Ciências Biológicas – Licenciatura na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza-PR. E-mail: denisefelicetti@gmail.com.

2. Luciana Borowski Pietricoski, Professora na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza-PR. E-mail: Luciana.borowski@uffs.edu.br.

This paper have the proposed to analyze a cytogenetic techniques of *H. malabaricus* in the natural populations present in the Capanema River, the southwest region of Paraná, belonging to the stretch of Iguaçu River. The females showed a diploid number of 40 chromosomes (14m + 26sm) and the males 39 chromosomes (14m + 25SM) belonging to the cariomorfo D, the which presents a sex chromosome system ($X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$). The C-banding showed the presence of heterochromatin in the regions centromeric and pericentromeric in largely of chromosomes. This search presents the first record the karyomorph D of *H. malabaricus* on the Iguaçu River basin, being this reported in the last stretch of course.

Keywords: Cytogenetics Fish. Chromosomal Evolution. Species Complex.

INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce da região neotropical possui uma riqueza considerável, podendo chegar até 5000 espécies (Nelson, 2006). No entanto, “tem-se que o número de espécies citogeneticamente investigadas é bastante diminuto, frente à diversidade encontrada nessa região (Artoni et al., 2000)”. Dentre os vertebrados, os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados (Nelson, 1984), possuindo posição basal na filogenia e uma enorme diversidade morfológica e de habitats. A posição geográfica em que o sudoeste do Paraná se encontra permite um grande favorecimento no estudo da ictiofauna, sendo o Brasil considerado, juntamente com os outros países da América do Sul, a chamada região neotropical, pois se considera que nenhum outro lugar no mundo tenha tanta diversidade de peixes de água doce. Envolvendo esse fator, essa pesquisa vem na perspectiva de colaborar com dados científicos nessa área, que se encontra em grande expansão, principalmente quando se trata da espécie *H. malabaricus*, sendo este um tema de grande discussão entre taxonomistas e citogeneticistas. Esta espécie é um modelo para estudos relacionados à evolução dos peixes neotropicais, por apresentar grande variação cariotípica ($2n=39$ a $2n=42$) representada por sete cariomorfos claramente identificados (Sampaio, 2011).

O grupo *H. malabaricus* apresenta grande variedade cariotípica. Esse grupo se caracteriza por ter “sete cariomorfos claramente identificados como base no número diploide, morfologia cromossômica e cromossomos sexuais” (Bertollo, et al. 2000). No entanto, pode-se dizer que embora usualmente referida como uma única entidade cromossômica, *H. malabaricus* possui uma grande diversidade cariotípica, apresentando diferenças populacionais significativas (Bertollo et al., 1978). Entretanto, a problemática taxonômica que ocorre com representantes do grupo *H. malabaricus* permanecem ainda à serem solucionadas. Estudo realizado por Sampaio (2011) alertam para um provável novo cariomorfo de *H. malabaricus*. Seria o cariomorfo H, de acordo com a sequência que vem sendo descrita, encontrado no Rio Xingu, além de outros trabalhos que vem sendo desenvolvidos nesta perspectiva.

De acordo com Maack (1981) apud Baumgartner et al. (2012), os rios Jangada, Iratim, Chopim, Santo Antônio e Capanema são os principais tributários da margem esquerda do Rio Iguaçu, sendo esse último o rio onde foram coletados espécimes de *H. malabaricus* para a análise cromossômica. Segundo Vicari et al. (2006), a bacia do Rio Iguaçu não é recente na origem. Como outros afluentes do Rio Paraná e o próprio Rio Paraná, a origem destes remonta a liquidação basáltica durante a formação da Serra Geral, no Cretáceo. Sendo assim, a fauna de peixes deste afluente é isolada em relação ao sistema do Rio Paraná devido a formação das Cataratas do Iguaçu, a cerca de 22 milhões de anos atrás (período Oligo-Mioceno). Este fato pode ter favorecido a especiação de espécies em um grau considerável, o que poderia explicar o grau de endemismo dessa bacia (Severi e Cordeiro, 1994 apud Vicari et al., 2006). Nessa perspectiva, *H. malabaricus* poderia ser considerada uma espécie não-nativa na bacia do Iguaçu, no entanto, os dados citogenéticos mostram que cariótipo A se encontra amplamente distribuída no sudeste do Brasil e nas regiões do sul (onde está inserida a bacia do Iguaçu), atingindo o Uruguai e Argentina (Bertollo et al., 2000).

Apesar de uma ampla distribuição geográfica, o grupo *Hoplias* apresenta baixa capacidade migratória, favorecendo a manutenção de rearranjos cromossômicos em pequenas populações e, conseqüentemente, um aumento na variabilidade cariotípica interpopulacional (Cioffi, 2010). No

baixo Iguaçu encontram-se distribuídos alopaticamente o cariomorfo A ($2n=42$) e o cariomorfo B ($2n=42$ XX/XY) de *H. malabaricus* e, sendo o Rio Capanema um importante tributário do Rio Iguaçu, esperaria ser encontrado neste a mesma configuração de cariótipos (A e B) (Bertollo et al., 2000; Vicari et al., 2006).

Esta pesquisa teve por objetivo geral caracterizar citogeneticamente a espécie *H. malabaricus*, utilizando técnicas citogenéticas clássicas para determinar o cariótipo da população dessa espécie, que se encontra no Rio Capanema, cidade de Realeza/PR, além de (1) identificar o/os cariomorfo/os de *H. malabaricus* que ocorre/m na extensão do Rio Capanema, Paraná; (2) utilizar os cromossomos como uma ferramenta para explicar a evolução cariotípica; (3) entender as relações dessa região com os processos evolutivos do complexo da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta

Primeiramente o projeto de pesquisa foi submetido ao SISBio, para a permissão da coleta e submetido ao CEUA (Comissão de Ética em Uso de Animais), sendo aprovado em ambos.

Os espécimes (4 fêmeas, 6 machos) foram coletados em lagoas naturais do Rio Capanema, no mês de maio/2015, com o auxílio de rede e anzóis. Imediatamente após a coleta, foram transportados em containers de plástico de 20L para o laboratório de Genética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel. No laboratório foram acondicionados em aquários aerados, onde permaneceram por 24h antes do início das técnicas, para que pudessem se ambientar.

Procedimento

Para a estimulação de mitoses foi utilizado o método de ação de leveduras, aumentando a divisão celular. Foi injetado subcutâneo, acima da linha lateral na região posterior, aproximadamente, uma solução de fermento biológico sacarosado (5g de fermento biológico: 5g de

açúcar cristal + 10 mL de água), em uma proporção de 10 mL para cada 100g de peso do animal por 48h. A preparação cromossômica foi realizada *in vivo*, de acordo com a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978). O rim é retirado e adicionado em um Becker com solução hipotônica KCl 0,075M. A hipotonização celular foi feita pela incubação do material em estufa a 37°C, por 20-30 min. A suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga, sendo pré-fixado com 15 gotas de fixador (3 metanol : 1 ácido acético) e centrifugada por 10 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado novamente fixador. O procedimento da centrifuga foi repetido três vezes, adicionando fixador novo a cada vez. O material foi armazenado em tubo de Eppendorf.

Para a análise do material, estes foram pingados em lâminas bem limpa e aquecida entre 55°C e 60°C, sendo deixado secar ao ar. Para tornar a observação possível, as lâminas foram coradas com giemsa (9 mL de tampão fosfato pH 6,8 : 1,5 mL de giemsa), por 7 min. Para a observação das metáfases, foi usado microscópio óptico, aumento de 100x. As metáfases completas foram fotografadas em um fotomicroscópio.

Para a obtenção de bandas C, foi seguida a metodologia descritas por Sumner (1972) com modificações de Lui *et al.* (2009). As preparações cromossômicas foram descoradas do giemsa com álcool 70% e incubadas em solução de HCl. Posteriormente, receberam tratamento alcalino pelo hidróxido de bário. Em seguida foram incubadas em solução salina de 2XSSC aquecida a 60°. Depois de secas, as metáfases foram coradas com iodeto de propídeo e deixadas por uma noite, para posterior análise.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A espécie *H. malabaricus* compreende a um complexo de espécies devido à sua ampla diversidade cariotípica, onde alguns cariomorfos são amplamente distribuídas geograficamente, enquanto outras têm menor distribuição e são restritas a certas bacias, podendo até mesmo ocorrer cariomorfos em simpátria sem a detecção de híbridos (Bertollo et al., 2000, Born e Bertollo 2006).

Os exemplares da população do Rio Capanema apresentaram número diplóide $2n=39$ e $2n=40$ para macho e fêmea, respectivamente, como mostra os gráficos 1 e 2.

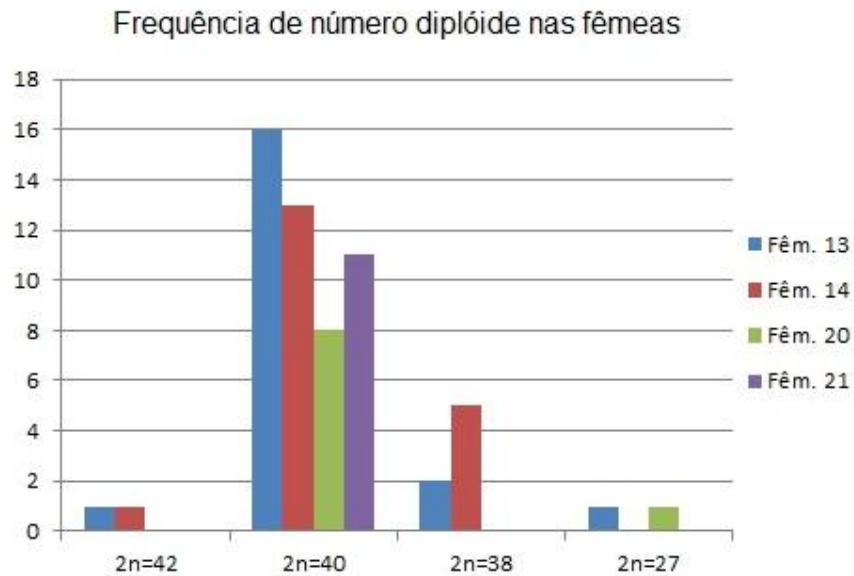


Figura 1- Frequência do número diplóide nas fêmeas em relação ao número de metáfases encontradas.

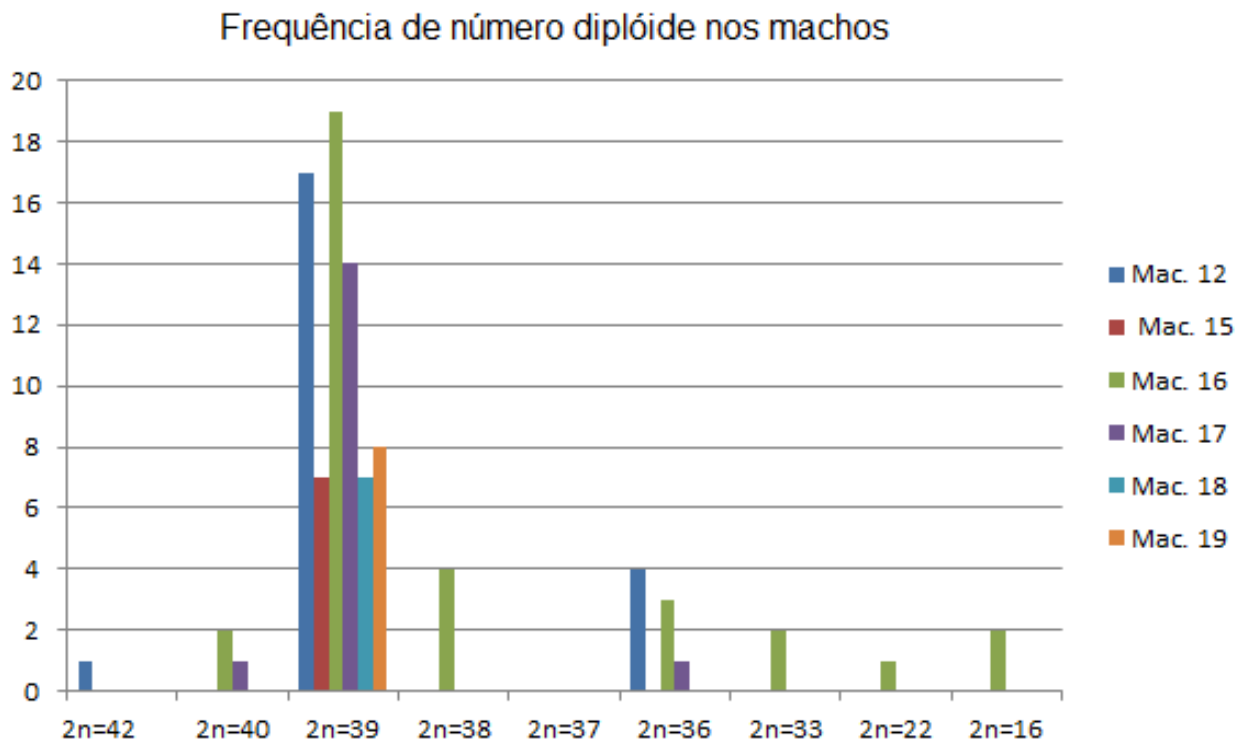


Figura 2- Frequência do número diplóide nos machos em relação ao número de metáfases encontradas.

Os resultados do gráfico mostram que as fêmeas apresentaram uma quantidade maior de metáfases (59 metáfases analisadas de 4 fêmeas) com número diploide de 40 cromossomos (14m + 26sm). Já os machos apresentaram uma quantidade maior de metáfases (72 metáfases analisadas de 6 machos) com número diploide de 39 cromossomos (14m + 25sm). Com isso, concluímos que os exemplares desta população pertencem ao cariomorfo D, o qual apresenta sistema de cromossomo sexual ($X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$), de acordo com a descrição de Bertollo et al., (2000). O bandamento C demonstrou a presença de heterocromatina nas regiões centroméricas e pericentroméricas em grande parte dos cromossomos.

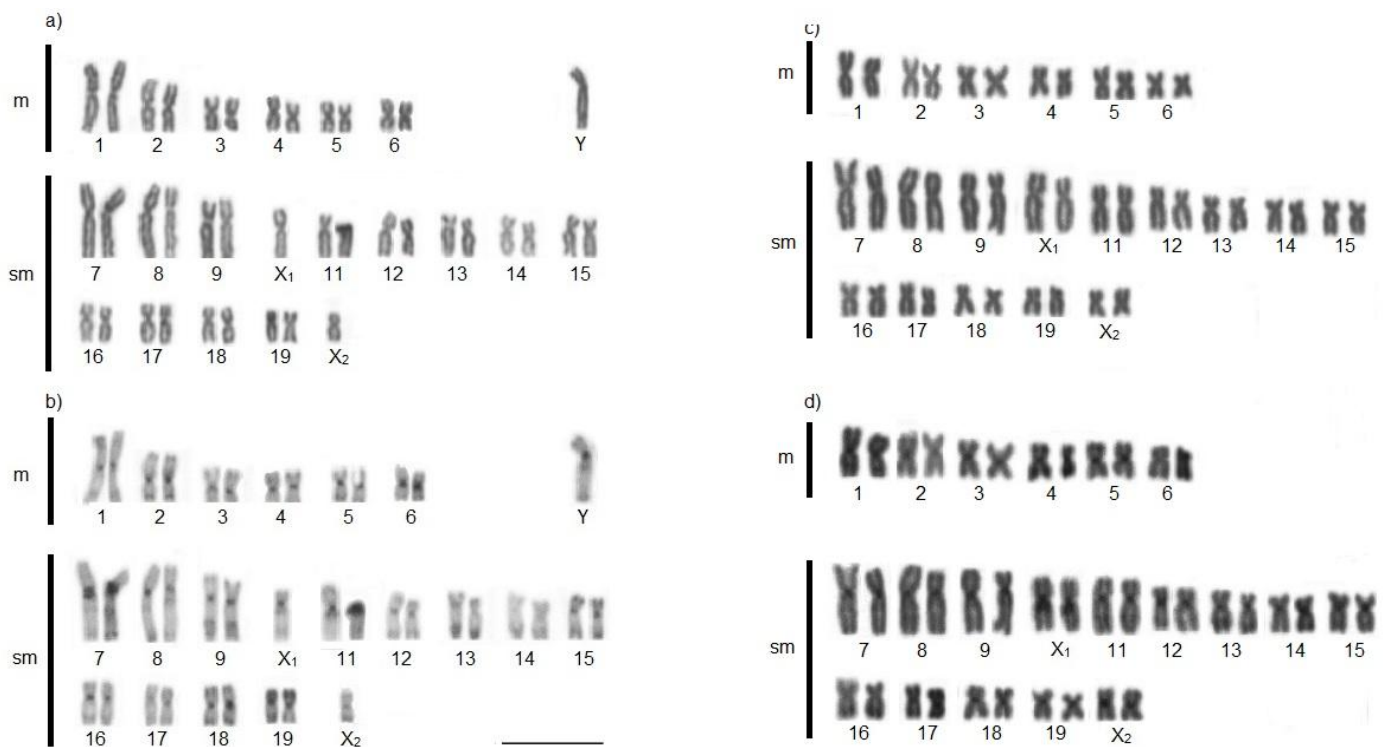


Figura 3- Cariomorfo D de *H. malabaricus* do Rio Capanema, Realeza/PR. a) cariomorfo de um macho, análise com giemsa; b) sequencial de banda C do macho; c) cariomorfo de uma fêmea, análise com giemsa; d) sequencial de banda C da fêmea. Barra = 10 μ m.

De acordo com dados de Vicari et al. (2006), duas populações de *Hoplias malabaricus* analisadas nos municípios de Nova Prata do Iguaçu e Palmeira, pertencentes à bacia do Rio Iguaçu no Paraná, apresentaram mesmo número diplóide, fórmula cariotípica e ausência de

cromossomos sexuais diferenciados, sendo este o cariomorfo A ($2n=42$), diferentemente dos resultados observados nas populações analisadas neste trabalho. Lemos et al. (2002) encontraram na região do Primeiro Planalto na bacia do Rio Iguaçu o cariomorfo B ($2n=42$ cromossomos com um sistema de cromossomos sexuais simples XX/XY). Estudos anteriores em populações de *H. malabaricus* do Rio Iguaçu mostrou que o cariomorfo mais amplamente distribuído na bacia é o cariomorfo A, de acordo com Gemi et al. (2014).

Estudos de Bertollo et al. (1997a) registraram a ocorrência do cariomorfo D em uma população natural de *H. malabaricus* da bacia do Alto Rio Paraná, com fêmeas apresentando $2n=40$ cromossomos e machos com $2n=39$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, respectivamente. Estes dados mostram que, como observado em outras regiões brasileiras, cariomorfos diferentes são encontrados para a espécie *H. malabaricus*.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, os espécimes de *H. malabaricus* analisados apresentaram as características cromossômicas de número diploide, presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos e fórmula cariotípica que se assemelham ao cariomorfo D do complexo de espécies *H. malabaricus* descritos por Bertollo et al. (2000), e que nunca haviam sido demonstradas abaixo do Rio Paraná.

CONCLUSÕES

Os espécimes analisados apresentaram características cromossômicas relacionados a um número diplóide, ausência de um sistema de cromossomos sexuais e cariótipo fórmula que se assemelham ao cariomorfo D do grupo *H. malabaricus* descrito por Bertollo et al. (2000). O cariomorfo D encontra-se no Alto Rio Paraná, sendo a primeira vez que este está sendo registrado abaixo do Rio Paraná, que se estende desde Foz do Iguaçu até o litoral sul do Uruguai.

AGRADECIMENTOS

Obrigada à Deus, por todas as suas providencias. Agradeço a todos que de certa forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Mas quero agradecer principalmente à Professora

Luciana, por toda dedicação. Agradeço ao Professor Roberto, pela disponibilidade em ajudar. A vocês, tenho que apenas...agradecer! Muito obrigada pela oportunidade de aprender, de sonhar e realizar. Obrigada Léo, por toda a paciência desde o início. Igualmente obrigada bem grande para Anahiê, Aline, Gisele, Mari, e principalmente à Simone, por me receber em sua casa. Obrigada a todos da UNIOESTE, lá sinto-me em casa!

Obrigada a todos da UFFS, pelo apoio sempre. Obrigada ao professor Fagner pelas orientações extra oficiais. Professor Ruben, aprendi muito contigo, obrigada por todas as coletas, aulas, viagens, cobranças, orientações, confidências e confiança. Aos técnicos Moacir, Cereto e Bertassi pela disposição em ajudar.

Não posso deixar de agradecer Mamãe Roseli e a mana Daiara. Mãe, te amo! Daiara, obrigada por ser minha irmã. Obrigada também às minhas irmãs de curso Mayza e Tatiana = inseparáveis e a todos da sala, pois caminhamos 5 anos juntos e hoje somos uma força só. E por último, mas de igual importância, agradeço ao meu marido, Alessandro, me apoiando sempre, obrigada minha vida.

REFERÊNCIAS

- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. 2000. **Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectiva**. Publicatio-UEPG, 6 (1): 43:60.
- BERTOLLO, L.A.C.; FONTES, M.S.; FENOCCHIO, A.S.; CANO, J. 1997a. The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Research** 5, 493-499.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIR A-FILHO, O. 1978. **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerde* (Pisces, Erythrinidae)**. Rev. Bras. Genet., 1(2)103-120.

BERTOLLO, L. A. C., BORN, G. G., DERGAM, J. A., FENOCCHIO, A. S. MOREIRA-FILHO, O. 2000. **A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.** *Chromosome Research*, 8: 603-613.

BLANCO, D. R. 2010. **Caracterização citogenética de populações alopatricas do gênero *Hoplias*, (Characiformes, Erythrinidae), com enfoque nos grupos *malabaricus* e *lacerde*.** Dissertação de mestrado (Genética e evolução). Dissertação de mestrado. São Carlos: UFSCar.

BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; BERTOLLO, L.A.C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. 2010a. **Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae).** *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20, 1-8.

BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; BERTOLLO, L.A.C.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. 2010b. **Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations.** *Neotropical Ichthyology* 8, 361-368.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. 2000. **An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome.** Kluwer Academic Publishers. Printed in the Nether lands.

CAVALLINI, N. M.; BERTOLLO, L. A. C. 1988. **Indução de mitoses em *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae).** In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E

APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 2, Maringá. Programas e Resumos. Maringá: Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura-NUPÉLIA, p.32.

CIOFFI, M. de B. 2010. **Marcadores cromossômicos em *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética comparativa entre cariomorfos.** Dissertação de mestrado (Genética e Evolução) São Carlos - UFSCar: São Paulo.

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.

LEMOS, P.M.M.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; CESTARI, M.M. 2000. **Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguazu river basin (Paraná State, Brazil).** *Caryologia* 55, 193-198.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. 1964a. **Nomenclatura for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas*, 52: 201-220.

MARTINS, N. F. 2013. **Evolução cromossômica em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética comparativa entre cariomorfos.** Dissertação de mestrado (genética e evolução). São Carlos: UFSCar.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 1991b. **Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish.** *Braz. J. Genet.*, 14: 1085-1090.

NELSON, J.S. 2006. **Fishes of the World.** John Wiley & Sons. 601p.

R. UTSONOMIA.; et al. 2014. **Genetic differentiation among distinct karyomorphs of the wolf fish *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes, Erythrinidae) and report of unusual hybridization with natural triploidy.** Journal of Fish Biology. Doi, 10.1111/jfb.12526

SAMPAIO, W. M. S. 2000. **Estudos citogenéticos em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1979) na região da Serra dos Carajas, nas bacias hidrográficas do Tocantins-Araguaia e do Xingu.**

Dissertação de mestrado, Viçosa-UFV, Minas Gerais.

VICARI, M. R.; PAZZA, R.; ARTONI, R. F.; MARGARIDO, V. P. BERTOLLO, L. A. C. 2006.

Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguazu river. Braz. arch. biol. technol.

Vol.49 no.2 Curitiba Mar.