

Encontro anual de
INICIAÇÃO 
CIENTÍFICA DA UNESPAR

DESCRIÇÃO CITOGENÉTICA DE *ASTYANAX SERRATUS* (PISCES, CHARACIDAE) DO RIO PINTADO - PORTO UNIÃO/SC

Daiane Niedzielski (PIC, Fundação Araucária)
Unespar/Campus de União da Vitória, daianeniedz@gmail.com
Carla Andreia Lorscheider (Orientadora)
Unespar/Campus de União da Vitória, profcarlacb@gmail.com
Thaís Aparecida Dulz (Coorientadora)
UFPR, thaisdulz@yahoo.com.br

RESUMO: Os peixes são considerados um excelente material para estudos citogenéticos por apresentar um grande número de variações cromossômicas que identificam, em parte, a adaptabilidade das espécies em diferentes ambientes. As espécies do gênero *Astyanax* demonstram ampla distribuição geográfica e difícil identificação a nível específico, devido as semelhanças morfológicas existentes entre elas. Fato, que reforça a importância de estudos sistemáticos de grupos aparentemente homogêneos que citogeneticamente podem ser considerados espécies distintas, embora a taxonomia tradicional em alguns casos não acompanhe estas observações. Perante esta situação, o presente estudo visou analisar e comparar citogeneticamente uma população de *Astyanax serratus* (5 machos e 4 fêmeas), coletados no rio Pintado, localizado em Porto União (SC) que é um afluente da bacia do Rio Iguaçu, tendo como recurso a citogenética clássica. Os espécimes analisados tanto machos quanto fêmeas mantiveram a conservação do seu número diploide de 50 cromossomos, e fórmula cariotípica (FC) composta por $4m+24sm+6st+16a$ e número fundamental (NF) = 84. Tais dados corroboram com os verificados por Kantek et al. (2008) em estudos citogenético realizados com a mesma espécie no Alto Iguaçu. O bandamento-C revelou heterocromatina positiva localizada preferencialmente em regiões teloméricas no braço curto dos pares 16 e em um dos cromossomos do par 4 e braço longo dos pares 15, 17, 19 e 22. Comparando com os resultados de Kantek et al. (2008) constatou-se marcações heterocromáticas semelhantes nos pares cromossômicos 15, 19, 22. No entanto, a marcação heterocromática do par 16 em *A. sp D* (*A. sp D* foi descrito por Garavello e Sampaio em 2010 como *A. serratus*) localizou-se na região telomérica do braço longo, o que também ocorreu no par número 4 e em apenas um dos cromossomos do par 17. Enquanto no presente estudo, o par 16 evidenciou marcações na região telomérica no braço curto e em apenas um dos cromossomos do par 4. No caso do par 17, ambos os cromossomos apresentaram marcações heterocromáticas. Tais variações podem ser atribuídas a polimorfismos, os quais são discutidos amplamente na literatura. Os dados citogenéticos obtidos no presente estudo são importantes marcadores para a população de *A. serratus* do Rio Pintado, e a citogenética foi uma excelente ferramenta para caracterizar essa população.

Palavras-chave: Lambari. Heterocromatina. Rio Iguaçu.

INTRODUÇÃO

Os peixes representam mais da metade de toda a biodiversidade de vertebrados existentes (POUGH, 2003). Distribuem-se por todos os ambientes marinhos e dulcícolas do planeta, com grande representatividade na região Neotropical que abriga cerca de um terço de toda a diversidade ictinofaunística (REIS, 2003). Tamaña fauna Neotropical deriva principalmente dos processos de especiação que sofreram os representantes que compõem as principais ordens de peixes que habitam essa região: Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (MALABARBA et al., 1998).

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

Os peixes pertencentes à região Neotropical expressam uma diversidade cromossômica elevada, com variações em número diploide, cromossomos sexuais, e cromossomos supranumerários, e muitos casos de variações estruturais chamados polimorfismos, que garantem em parte o sucesso evolutivo do grupo (GARUTTI, 1998). Esse amplo registro de variações cromossômicas atrai o interesse dos pesquisadores que encontram nesse grupo um excelente modelo de estudo sobre variabilidade genética e evolução (SANTOS, 2010).

Segundo Porto-Foresti et al. (2001), os estudos cromossômicos em peixes têm proporcionado a compreensão de uma série de mecanismos de diversificação genômica, entre estes, os rearranjos cromossômicos envolvidos na diversificação de gêneros ou famílias, na diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais, na origem e manutenção dos cromossomos B, além de outros.

A citogenética de peixes fornece dados importantes que corroboram em uma melhor compreensão das relações evolutivas entre os organismos, tornando os resultados dos estudos mais conclusivos ao incluir dados sobre morfologia, biogeografia, comportamento e biologia das espécies analisadas (ARTONI et al., 2000). Bertollo et al. (1986), discorrem ainda que a citogenética pode representar um eficiente complemento nas investigações de taxonomia e sistemática, e tais estudos, podem auxiliar na identificação de novas espécies ou na classificação de indivíduos taxonomicamente problemáticos.

Reis (2003), ao revisar dados cromossômicos no gênero *Astyanax*, revelaram que há uma grande variedade cariotípica nas espécies que compõem esse gênero. Assim, estudos citogenéticos nesse grupo torna-se interessante.

As espécies de peixes que compõem o gênero *Astyanax*, estão alocados como *Incertae Sedis* em Characidae, considerada a mais complexa e abundante família da ordem Characiformes (BRITSKI et al., 2007). Esse gênero de caracídeo é bastante diverso, composto por mais de 150 espécies válidas (ESCHREMEYER, 2015) que estão amplamente distribuídos na região Neotropical (ALMEIDA, 2007).

Segundo Garutti (1995), *Astyanax* é um gênero complexo, podendo apresentar morfologia e padrões de coloração muito semelhantes entre as diferentes espécies. Segundo o mesmo autor, classificar especificamente esse gênero é trabalhoso devido às similaridades morfológicas entre diferentes indivíduos. A premissa nesse ponto revela-se em uma crescente necessidade de realizar estudos sistemáticos de grupos aparentemente homogêneos que geneticamente podem ser consideradas espécies distintas do ponto de vista taxonômico (PAIZ, 2013).

Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi analisar os dados cariotípicos em espécimes da população de *Astyanax serratus*, provenientes do Rio Pintado, Porto União/Santa Catarina, para a caracterização da população.

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

MATERIAIS E MÉTODOS

A área de estudo foi o rio Pintado, com localização na cidade de Porto União – Santa Catarina (26°16'41.66"S, 51°2'55.10"W) (Figura 1), o qual é um afluente da bacia do rio Iguaçu. O local de coleta onde os espécimes foram capturados é uma região que apresenta mata nativa ao seu contorno o que torna o ambiente lótico uma área com menos agentes que possam ser considerados estressores para a biodiversidade local do ambiente.

Os espécimes de *Astyanax serratus* foram coletados com auxílio de vara de pesca. Os indivíduos capturados foram transportados vivos, com auxílio de uma caixa de isopor contendo água do próprio rio, para o laboratório de Biologia Experimental da Universidade Estadual do Paraná *Campus* de União da Vitória, e mantidos em aquários aerados.

Em seguida, houve a realização dos procedimentos de estimulação de metáfases mitóticas e técnicas decorrentes.

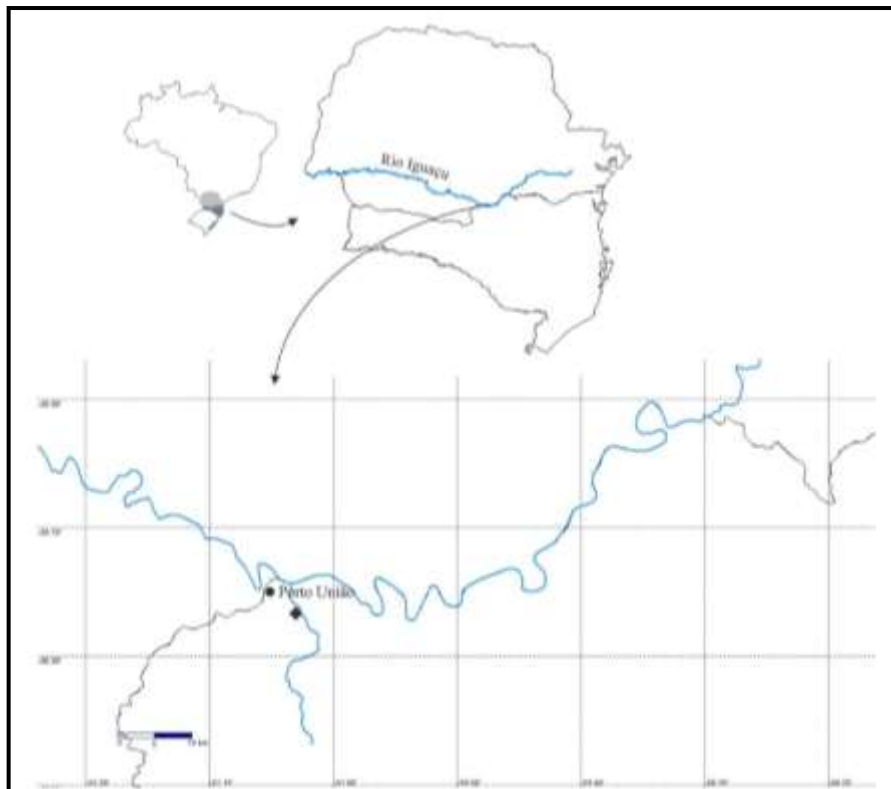


Figura 1. Mapa da bacia hidrográfica do rio Iguaçu, Paraná e Santa Catarina, Brasil, em destaque (◆) o rio Pintado localizado no município de Porto União (●). Fonte: Google Maps.

Espécimes de *Astyanax serratus*

Foram analisados 5 machos e 4 fêmeas de *A. serratus* (Figura 2) provenientes do Rio Pintado. Os espécimes foram identificados e depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA (NUP 16890), da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil).



Figura 2. Exemplar de *Astyanax serratus*, coletados no rio Pintado, pertencente à bacia hidrográfica do rio Iguaçu, Santa Catarina, Brasil.

Técnicas

Antes do sacrifício dos animais, os mesmos foram anestesiados com óleo de cravo. As técnicas utilizadas foram à coloração convencional ou Giemsa e a técnica de marcação da heterocromatina constitutiva ou Banda C.

Procedimentos

Obtenção de cromossomos mitóticos segundo Bertollo e colaboradores (1986)

Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/100g de peso. Manter o peixe em aquário bem aerado entre 50 e 60 minutos. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo óleo de cravo diluído a 0,01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha. Incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos. Resuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, colocando-o em um tubo de centrífuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, resuspendendo o material repetidas vezes.

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 mL do mesmo fixador, resuspende bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm. Repetir o último passo. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de metanol para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 mL) e resuspende bem o material. Acondicionar em tubos do tipo “eppendorfs”. Nesta etapa, o material será armazenado em freezer, para posterior utilização.

Para o preparo das lâminas, primeiramente, estas foram devidamente limpas e incubadas em um béquer contendo água a uma temperatura de aproximadamente 60°C. Posteriormente, o material armazenado em “eppendorfs” será retirado do freezer, resuspendido e com o auxílio de um conta-gotas e serão pingadas duas gotas na lâmina.

Após as lâminas secarem em temperatura ambiente, serão coradas com Giemsa diluída em tampão fosfato (pH 6,8) a 5%. O corante preparado será colocado sobre as lâminas cobrindo toda a sua extensão, permanecendo por 10 minutos. Em seguida, seu excesso será retirado com água corrente e então após secar a lâmina, estas serão analisadas junto ao microscópio.

Deteção de heterocromatina constitutiva segundo Sumner (1972)

Tratar a lâmina já contendo as gotas do material para análise, com HCl em temperatura ambiente em estufa, por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Incubar em solução salina de 2xSSC, a 60°C em banho-maria por 15 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar. Incubar a lâmina por 30 segundos em solução de hidróxido de bário Ba(OH)₂, em banho-maria a 42°C, com o Ba(OH)₂ sendo recém preparado e filtrado. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, e depois em água deionizável, deixar secar ao ar. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora. Lavar em água corrente e secar ao ar. Corar com Giemsa 5% durante 5-10 minutos. Lavar em água corrente.

Montagem dos Cariótipos

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41. As imagens foram capturadas com utilização do software Image Pro Plus – Cool SNAP-pro (Media Cybernetic) em Câmara de Captura Olympus DP71 12 mp no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Paraná. As fotografias dos cromossomos foram recortadas no programa Adobe Photoshop CS5 e em seguida os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan et al., (1964) e revista por Guerra (1986) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

RB= 1,00 - 1,70 / metacêntrico (m);

RB= 1,71 - 3,00 / submetacêntrico (sm);

RB= 3,01 - 7,00 / subtelocêntrico (st);

RB= maior que 7,00 / acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos serão considerados com 2 braços cromossômicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Astyanax* apresenta uma ampla variedade cariotípica, seja quanto ao número ou estrutura cromossômica. Neste gênero, existe uma variação de $2n=36$ cromossomos em *Astyanax schubarti* (MORELLI et al., 1983) até $2n= 50$ cromossomos, considerado o número modal para a maiorias das espécies de *Astyanax* (PAZZA e KAVALCO, 2007), como o observado para machos e fêmeas da população de *Astyanax serratus* do rio Pintado (Porto União/SC) analisados (Figura 3A).

Segundo Artoni e Matiello (2003), a ordem Characiformes exibe um padrão de diversificação cromossômica alta, com especial atenção à família Characidae, que tem uma grande variabilidade interpopulacional quanto ao número e estrutura cromossômica, provavelmente, pelo estilo de vida mais sedentário, propiciando a diversificação entre populações isoladas. Apesar da diversidade cariotípica da família Characidae, o gênero *Astyanax* apresenta características ancestrais dos caracídeos, como o número diplóide de 50 cromossomos e o primeiro par de metacêntricos como o maior do complemento (KANTEK, 2005). O primeiro par cromossômico é do tipo metacêntrico grande, característico da família (MORELLI et al., 1983; PORTELLA et al., 1988), o qual ocorre no cariótipo de *Astyanax serratus* o qual compartilha essas duas semelhanças cariotípicas com outras espécies do gênero.

A população de *Astyanax serratus* do rio Pintado (Porto União/SC) revelou a fórmula cariotípica (FC) composta por 4 cromossomos metacêntricos, 24 cromossomos metacêntricos, 6 cromossomos subtelocêntricos e 16 cromossomos acrocêntrico e número fundamental (NF) = 84 (Figura 3A). Resultados semelhantes observados para a população de *Astyanax* sp D proveniente da região do Alto Iguaçu, PR (KANTEK et al., 2008). *Astyanax* sp D foi estudada taxonomicamente por Garavello e Sampaio (2010) e foi nomeada como *Astyanax serratus*, uma espécie endêmica do Rio Iguaçu.

O bandamento-C revelou heterocromatina positiva localizada preferencialmente em regiões teloméricas no braço curto dos pares 16 e em um dos cromossomos do par 4 e braço longo dos pares 15, 17, 19 e 22 (Figura 3B). Kantek et al. (2008), verificaram marcações heterocromáticas semelhantes nos pares cromossômicos 15, 19, 22, considerando o seu estudo abordaram variações interindividuais

**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

de heterocromática em *A. sp D*. No entanto, a marcação heterocromática do par 16 em *A. sp D* localizou-se na região telomérica do braço longo, o que também ocorreu no par número 4 e em apenas um dos cromossomos do par 17. Enquanto no presente estudo, o par 16 evidenciou marcações na região telomérica no braço curto e em apenas um dos cromossomos do par 4. No caso do par 17, ambos os cromossomos apresentaram marcações heterocromáticas. As variações de localização e quantidade de heterocromatina constitutiva podem ser atribuídas a polimorfismos, os quais são discutidos amplamente por Mantovani et al. (2000).

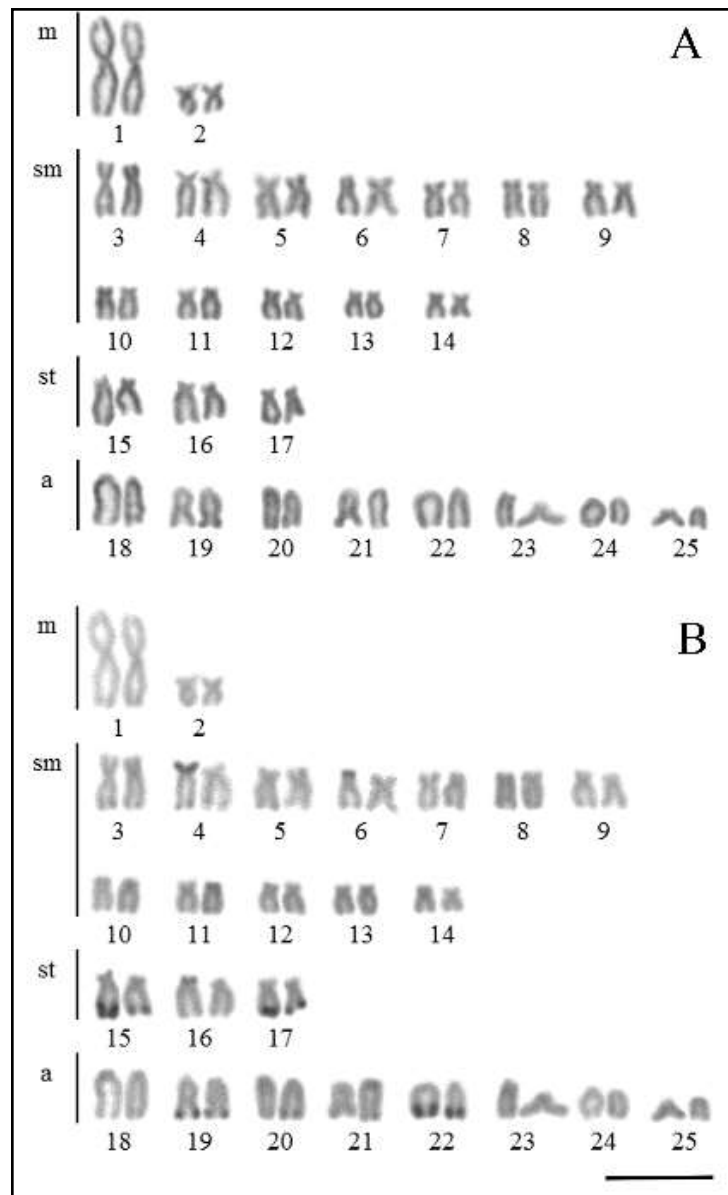


Figura 3. *Astyanax serratus*, coletados no rio Pintado, pertencente a bacia hidrográfica do rio Iguaçú, Santa Catarina, Brasil. (A) Corado com Giemsa e (B) bandeamento C. Legenda: a barra corresponde a 10µm, m (metacêntrico), sm (submetacêntrico), st (subtelocêntricos) e a (acrocêntrico).

Nos Characidae, a especiação por alopatria é apontada como o provável mecanismo gerador de diversidade entre grupos, assim como o que ocorre em regiões montanhosas, onde os sistemas

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

hídricos apresentam-se limitados geograficamente por elevações (FUTUYMA, 1997). De uma forma geral, os peixes representam um grupo cujo deslocamento é restrito em sua bacia, uma vez que, para praticamente todos os grupos, percursos de terra seca representam barreiras intransponíveis, limitando a troca de genes por fatores geográficos, embora a mesma calha dos grandes rios possa ser um divisor efetivo para a fauna das cabeceiras (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). O principal habitat de *Astyanax serratus* segundo Sampaio (1998), são as cabeceiras de pequenos rios, característica que favorece a ocorrência de diferenciação cromossômica e morfológica entre as pequenas populações assim isoladas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A citogenética de peixes é uma ciência que têm alcançado resultados que auxiliam na compreensão de diversos mecanismos de diversificação genômica dentro dos grupos o que torna os resultados das pesquisas mais conclusivas ao incluir dados genéticos em seus estudos. Dessa forma, os dados citogenéticos obtidos no presente estudo são importantes marcadores para a população de *A. serratus* provenientes do Rio Pintado (SC) que pode apresentar a formação de isolados populacionais causando eventos de especiação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. B. C. *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

ARTONI R. F.; MATIELLO, M.C.A. Genética de peixes neotropicais. I. Aspectos da conservação genética dos peixes no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, 9 (2): 7-15, jun, 2003.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Neotropical fish Cytogenetics: Methods, Results and Perspectives. **Biological and Health Sciences**, 6 (1): 43-60, 2000.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M. Jr. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish Biol.** 28: 153-159, 1986.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

ESCHREMEYER, W. N. Ed.). **Catalog of fishes**. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em: 08, Julho, 2015, 10 horas.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997.

**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Braz. J. Biol.** 70 (3): 847-865, 2010.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica.** Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 1995.

GARUTTI, V. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Pisces, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia Ser Zool** 85: 115- 122, 1998.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revis. Brasil. Genet.**, 9:21-40, 1986

KANTEK, D. L. Z. **Estudo citogenético comparativo entre populações de uma espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) endêmica do Rio Iguaçú.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

KANTEK, D.L.Z. et al. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguaçú River. **Genetics and Molecular Biology** 31: 239–242, 2008.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia** 56 (4): 453-461, 2003.

LEVAN, A. FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclatura for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas** 25(2): 201-220, 1964.

MALABARBA, R.E.R.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. **Phylogeny and classification of neotropical fishes.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.

MANTOVANI, M., ABEL, L.D.S., MESTRINER, C.A. & MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109: 161-168, 2000.

MORELLI, S. et al. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Kariotypic variability. **Caryologia** 36(3): 235–244, 1983.

PAIZ, L.; M. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do rio Iguaçú, Parque Nacional do Iguaçú, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia da Conservação). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 2013.

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F. Chromosomal evolution in the Neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The Nucleus** 50 (3): 519-543, 2007.

PORTELA, A.L.B.S., GALETTI JR, M., BERTOLLO, L.A.C. Considerations on the Chromosome Evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazil. J. Genet.** 11 (2): 307-316, 1988.

**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura** 11 (67), 2001.

POUGH, F.H., JANIS, C.M., HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003.

REIS, R.E. Family Characidae. In: Reis, R.E., Kullanders, S.O. & Ferraris, C.J. **Check list of the fresh water fishes of south and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da Bacia do Rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1998.

SANTOS, N. M. D. **Mapeamento gênico de sítios repetitivos de DNAr 5S e 18S em *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, SP, 2010.

SUMNER, A.T.A. Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterocromatin. **Cell Research** 75: 304-306, 1972.