



## Caracterização citogenética de *Geophagus iporangensis* Haseman, 1911 (Cichliformes, Cichlidae) da área de influência do Lago de Itaipu, município de Santa Helena, Paraná.

### Citogenetic Characterization of *Geophagus iporangensis* Haseman, 1911 (Cichliformes, Cichlidae) from the Influence Area of Itaipu Lake, Santa Helena Municipality, Paraná

Paola Janaina Schoninger da Silva<sup>1</sup>, Vanessa Bueno da Silva<sup>2</sup>

#### RESUMO

A região neotropical é um grande destaque pela sua biodiversidade. Nela estão localizadas grandes bacias hídricas, rios, riachos e córregos, que contêm muita vida em suas águas. Dentre várias bacias desta região, pode-se destacar a Bacia do Alto Paraná por sua grande extensão e por ser habitat de diversos grupos de peixes, como os ciclídeos, onde o peixe utilizado nesse estudo está alocado. Esse estudo descreve o cariótipo de *Geophagus iporangensis* Haseman, 1911. Os espécimes foram coletados no rio Paraná, na área de influência do lago de Itaipu, em Santa Helena, Paraná, Brasil. A espécie analisada apresentou  $2n = 48$  cromossomos, não sendo observado cromossomos sexuais. Com base em técnicas de bandamento foi possível detectar as regiões de heterocromatina constitutiva e as regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS). Foram observadas bandas heterocromáticas principalmente na região centromérica dos cromossomos. As AgRONS foram simples, localizadas no braço curto do par XXX. O cariótipo observado para *G. iporangensis* é similar ao observado em outras espécies de *Geophagus*, especialmente *G. brasiliensis*. As novas informações sobre a organização do cariótipo dessa espécie reforça sua proximidade com *G. brasiliensis*, conforme já indicado por estudos filogenéticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** “cará”; cariótipo; ciclídeos; peixes de água doce.

#### ABSTRACT

The Neotropical region is a major highlight for its biodiversity. It is home to large river basins, rivers, streams, and creeks, which contain a lot of life in their waters. Among the various basins in this region, the Upper Paraná River Basin can be highlighted for its large extent and for being the habitat of several groups of fish, such as cichlids, where the fish used in this study is located. This study describes the karyotype of *Geophagus iporangensis* Haseman, 1911. The specimens were collected in the Paraná River, in the area of influence of Itaipu Lake, in Santa Helena, Paraná, Brazil. The species analyzed had  $2n = 48$  chromosomes, with no sex chromosomes being observed. Based on banding techniques, it was possible to detect regions of constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (AgNORs). Heterochromatic bands were observed mainly in the centromeric region of the chromosomes. The AgNORs were simple, located on the short arm of the XXX pair. The karyotype observed for *G. iporangensis* is similar to that observed in other species of *Geophagus*, especially *G. brasiliensis*. The new information about the organization of the karyotype of this species reinforces its proximity to *G. brasiliensis*, as already indicated by phylogenetic studies.

**KEYWORDS:** “cará”; karyotype; cichlids; freshwater fish.

<sup>1</sup> Bolsista do CNPQ . Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: [spaolajanaina@gmail.com](mailto:spaolajanaina@gmail.com). ID Lattes: 5648634129305228.

<sup>2</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais e Sustentabilidade/Curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: [vanessab@utfpr.edu.br](mailto:vanessab@utfpr.edu.br). ID Lattes: 5241879670491834.



## INTRODUÇÃO

A ordem Cichliformes foi reconhecida recentemente através de estudos evolutivos e morfológicos, anteriormente considerada Perciformes. Nela está localizada a família de maior distribuição não peixes não ostariófiseos, os ciclídeos neotropicais (Betancur-R. et al. 2013). Dentre os ciclídeos neotropicais o gênero *Geophagus* pode ser destacado por sua ampla distribuição geográfica e abundância nas regiões de águas doces, ocupando toda a região neotropical, além de suas características morfológicas, com destaque em suas cores fortes e brilhantes, acredita-se que muitas dessas espécies ainda não foram compreendidas devido seus aspectos morfológicos e de distribuição (Kullander, 2003). Relacionado aos trabalhos de caracterização citogenética a espécie *Geophagus iporangensis* não possuía um cariótipo definido, assim como outros peixes do mesmo gênero. Portanto, verifica-se que os dados desse grupo não estão totalmente estruturados, juntamente com os problemas de distribuição e classificação. Como exemplo desses problemas de gênero pode-se citar o complexo *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), onde *Geophagus iporangensis* estava alocado. Recentemente esse grupo passou por uma revisão que mostrou que as duas espécies (*G. brasiliensis* e *G. iporangensis*) são consideradas irmãs (Argolo, 2020). O grupo *Geophagus brasiliensis* apresenta um número diplóide (2n) igual a 48 e sem a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (MOREIRA-FILHO, 2010). Considerando o exposto, aliado à inexistência de dados relacionados à caracterização cromossômica e citogenética de exemplares de *Geophagus iporangensis* na área de influência do lago Itaipu: município de Santa Helena, Paraná (Bacia do Alto Paraná), tal levantamento se faz necessário para uma maior compreensão da biodiversidade ictiofaunística local. Adicionalmente, os dados obtidos podem contribuir para elucidar questões de ordem evolutiva e taxonômica, inerentes ao grupo. O objetivo deste estudo é analisar cromossomicamente e comparar o cariótipo de exemplares de *Geophagus iporangensis* com *Geophagus brasiliensis* coletados em diferentes regiões do Brasil.

## MATERIAIS E METODOS

### COLETA DOS ESPÉCIMES A SEREM ANALISADOS

A pesquisa começou a ser desenvolvida a partir do mês de julho de 2022. Os indivíduos foram coletados em diferentes pontos do município de Santa Helena / PR, utilizando-se de varas de pesca, peneiras e tarrafas. A presente análise é parte de um projeto que engloba um número maior de espécies, aprovado pelo CEUA UNNIOESTE (protocolo 09-23). Após coletados, todos os indivíduos foram levados, em sacos plásticos fechados com oxigênio, até o laboratório de Ictiologia da UTFPR, Campus Santa Helena, onde foram mantidos vivos em aquários aerados até o momento da preparação do material.



## OBTENÇÃO DE MITOSES POR TRATAMENTO “*in vitro*”

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais do rim anterior e posterior, seguindo as técnicas descritas por Foresti et al. (1993). Pequenos pedaços do rim foram colocados em uma placa de Petri contendo 10 ml de uma solução salina de Hanks, e o tecido foi cuidadosamente dissociado. Em seguida, a suspensão celular resultante foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida foram adicionadas de 1 a 2 gotas de uma solução de Colchicina a 0,016% e misturadas com o material. Esta mistura foi colocada em uma estufa a 36°C por 30 minutos e depois centrifugada a 1100 rpm por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado, e 10 ml de uma solução hipotônica (KCl 0,075M) foram adicionados, misturando bem com o material usando uma pipeta Pasteur. O material foi novamente colocado na estufa a 36°C por mais 30 minutos.

Posteriormente, cerca de 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético - na proporção de 3:1) foram adicionadas ao material e misturadas repetidamente. O material foi deixado em repouso por 5 minutos e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O líquido sobrenadante foi descartado e mais 10 ml de fixador foram adicionados, misturando novamente com o material e repetindo o processo de centrifugação por 10 minutos. Esse procedimento de fixação foi repetido mais duas vezes, descartando o sobrenadante a cada vez. Então o material foi armazenado no fixador para obter uma suspensão celular com uma concentração intermediária.

Por fim, o material foi gotejado sobre lâminas limpas e aquecidas a cerca de 50-60 °C. Após a secagem ao ar, o material passou por uma coloração com uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato com pH 6,8 por 5 a 8 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e deixadas secar ao ar (FORESTI; OLIVEIRA; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, 1993).

## CLASSIFICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos conforme a razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964), onde o limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00-1,70 , metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00 , subtelocêntrico (st);

RB= >7,00 , acrocêntrico (a).

## BANDAMENTO C

O método para determinar o padrão de distribuição da heterocromatina seguiu as diretrizes de Sumner (1972). Inicialmente, as lâminas foram submetidas a um tratamento



com uma solução de ácido clorídrico 0,2N por um período de 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, elas foram lavadas com água destilada e imersas em uma solução de hidróxido de bário a 5%, mantida a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos.

Após a conclusão dessa etapa de tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N, seguido por uma lavagem com água destilada e, por fim, foram incubadas em uma solução salina 2xSSC a 60 °C por 30 minutos. Após essa etapa, foi realizada uma última lavagem com água destilada para finalizar o processo (Sumner, 1972).

## CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO

Para identificar as Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) que estavam ativas em uma interfase anterior, seguimos o procedimento descrito por Howell & Black (1980). Inicialmente, sobre a lâmina contendo os cromossomos, foram aplicadas duas gotas de uma solução aquosa de gelatina (preparada com 1g de gelatina para cada 100mL de água destilada, adicionando-se também 0,5 ml de ácido fórmico). Em seguida, foram adicionadas quatro gotas de uma solução aquosa de Nitrato de Prata (50%). A lâmina foi coberta com uma lamínula e incubada em uma estufa a 60°C por aproximadamente sete minutos, monitorando-se a coloração durante esse período.

Após a remoção da lamínula, a lâmina foi lavada com água destilada e as metáfases observadas por meio de microscopia óptica para a detecção das NORs (Howell & Black, 1980).

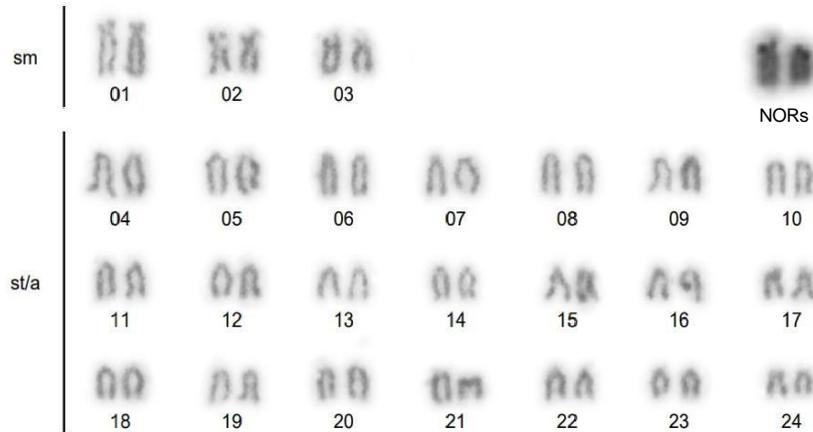
## ANÁLISES CARIOTÍPICAS

As preparações cromossômicas obtidas e as técnicas mencionadas anteriormente foram examinadas utilizando um microscópio óptico convencional. Para realizar a contagem dos cromossomos e observações mais detalhadas, utilizamos uma objetiva de imersão. As imagens que foram selecionadas para análise foram capturadas por meio de uma câmera QColor5M conectada a um microscópio Olympus BX53.

## Resultados e discussões

Os seis exemplares (4 fêmeas e 2 machos) de *Geophagus iporangensis* analisados no presente trabalho apresentaram  $2n=48$  cromossomos, sendo 6 cromossomos submetacêntricos e 42 subteloacêntricos/acrocêntricos (figura 1), e as Regiões organizadoras de Nucléolo foram observadas no braço menor de dois cromossomos, assim como *G. brasiliensis*. Já o número diploide 48 também é observado em *G. brasiliensis* e em outras espécies do gênero como *Geophagus proximus* (CASTELNAU, 1855) e *Geophagus surinamensis* (Bloch, 1791) (MORAES, 2009).

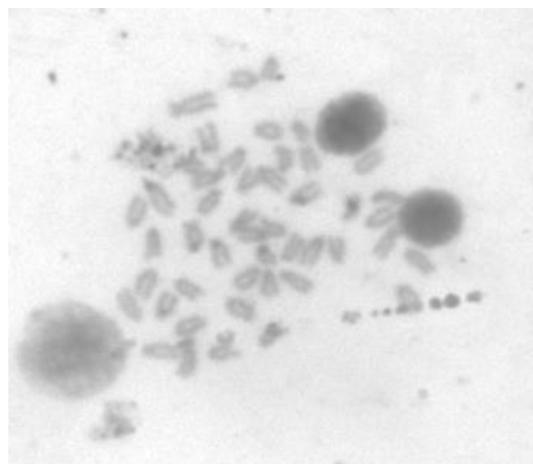
Figura 1 – Cariótipo de *Geophagus iporangensis* submetido à coloração por Giemsa



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

A técnica de bandamento C destacou regiões heterocromáticas centroméricas nos cromossomos que apresentam marcações (figura 2). Em *G. brasiliensis* as regiões heterocromáticas também foram observadas próximas ao centrômero (SILVA, 2012)

Figura 2 - Metáfase de *Geophagus iporangensis* submetida à bandamento C



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

## Conclusão

Concluí-se que número diploide 48 é conservado entre a maioria das espécies desse gênero, as Regiões organizadoras de nucléolo também apresentaram o padrão que o gênero possui, localizadas em braços menores de dois cromossomos e o bandamento C apresentou regiões de heterocromatina constitutiva centroméricas, assemelhando-se com outras espécies do gênero. Portanto os resultados apresentados assemelham-se com a literatura específica consultada do grupo irmão (*G. brasiliensis*).



## Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária (FA), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse

## REFERÊNCIAS

ARGOLO, Leandro Araujo et al. Unraveling the systematics and evolution of the 'Geophagus' brasiliensis (Cichliformes: Cichlidae) species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 150, p. 106855, 2020.

BETANCUR-R, Ricardo et al. The tree of life and a new classification of bony fishes. **PLoS currents**, v. 5, 2013.

HOWELL, WM t; BLACK, DA Coloração controlada com prata de regiões organizadoras de nucléolo com um revelador coloidal protetor: um método de 1 etapa. **experientia**, v. 36, n. 8, pág. 1014-1015, 1980.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

LEVAN, Albert; FREDGA, Karl; SANDBERG, Avery A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

MOREIRA-FILHO, Orlando et al. Comparative cytogenetic study among three fish species: an analysis from a water divide region. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2010.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813, 1993.

KULLANDER, Sven O. Family cichlidae. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, p. 605-654, 2003.

MORAES, Brenda Natasha Gerhardt. Evolução Cromossômica de Geophagus {perciformes, Cichlidae) da Amazônia Central. **XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA**, 2009.

SILVA, Ana Paula Alves. Heteromorfismo cromossômico em populações de Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824)(Teleostei: Cichlidae) da bacia do Rio Doce, Brasil. 2012.