

**ESTUDO CROMOSSÔMICO DE UMA POPULAÇÃO DE TRAÍRA,
Hoplias malabaricus (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE),
PROVENIENTES DO MÉDIO RIO IGUAÇU**

Luciano Weiwanko¹

Rafael Bueno Noleto²

Resumo: A espécie *Hoplias malabaricus* é um dos principais representantes dos eritrinídeos neotropicais, caracterizada por um amplo polimorfismo cariotípico, uma vez que até o momento sete cariomorfos já foram descritos. Considerada por diversos autores como um complexo de diferentes espécies, *H. malabaricus* possui taxonomia confusa e, desse modo se faz necessário mais estudos cobrindo maiores áreas de amostragem para melhor compreender a origem dos cariomorfos. O presente estudo teve como objetivo realizar uma análise do cariótipo da espécie acima referida proveniente do médio Rio Iguaçu, segundo planalto paranaense. Os espécimes foram coletados no município de Cruz Machado - PR e submetidos a análises de citogenética clássica, enfocando o número diploide através de coloração com Giemsa, o padrão da heterocromatina constitutiva (Bandas C) e a localização dos genes ribossômicos 45S (Regiões Organizadoras de Nucléolos - RONS) através de impregnação com nitrato de prata. Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo com $2n = 42$ cromossomos, RONS múltiplas e bandas C no centrômero de todos os cromossomos, além de algumas marcações teloméricas em alguns pares. Este padrão caracteriza o cariomorfo A, cuja estrutura cariotípica é a de maior frequência na bacia do Rio Iguaçu. Frente ao fato de ser considerado um complexo de espécies, aspectos biogeográficos e de evolução cromossômica, enfatizando transformações cariotípicas entre os cariomorfos ocorrentes nesta bacia são discutidos.

Palavras-chave: cariomorfos, citogenética clássica, traíra.

**CHROMOSOME STUDY OF A POPULATION OF THRAIRA FISH,
Hoplias malabaricus (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE), FROM
THE MIDDLE IGUAÇU RIVER**

Abstract: *Hoplias malabaricus* species is among the main representative erithrinid fish of Neotropical region, characterized by a wide karyotypic polymorphism, since so far seven karyomorphs have been reported. Considered by many authors as a species complex, the current state taxonomic knowledge of *H. malabaricus* species is still confused, thus requires more studies covering larger sampling areas to better understand the origin of karyomorphs. The present study aimed to perform a karyotype analysis of *H. malabaricus* from the middle

¹ Graduado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, campus União da Vitória. E-mail: luweiwanko@hotmail.com

² Professor do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória. União da Vitória. Caixa Postal 241. CEP 846000-00. E-mail: rafanoletto@yahoo.com.br

Rio Iguaçu, second Paraná plateau. The specimens were collected in Cruz Machado municipality and submitted to classical cytogenetics analysis, focusing on the diploid number by Giemsa staining, constitutive heterochromatin pattern (C-bands) and the location of ribosomal genes 45S (nucleolus organizer regions - NORs) by silver nitrate impregnation. The specimens analyzed showed a karyotype with $2n = 42$ chromosomes, multiple NORs and C-bands at the centromere of all chromosomes and eventually, in a telomeric position in some pairs. This pattern characterizes the karyomorph A, whose karyotype is the most frequent in the Iguaçu river basin. Given the fact that it is considered a species complex, aspects of biogeography and chromosomal evolution, emphasizing karyotypic changes between karyomorphs of this basin, are discussed.

Key-words: karyomorphs, conventional cytogenetics, trahiras.

INTRODUÇÃO

A região neotropical é caracterizada por apresentar a maior e mais diversificada ictiofauna de água doce do mundo, representada principalmente pelas ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (LUNDBERG et al., 2000; VARI e MALABARBA, 1998). Dentre as ordens mais abundantes na América do Sul, os Characiformes representam o grupo com a maior abundância entre os teleósteos neotropicais, sendo representados por 15 famílias e contendo aproximadamente 37% das espécies já descritas até então para esta ordem (ALMEIDA, 2010).

A família Erythrinidae representa um pequeno táxon dentro dos Characiformes, compreendendo três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, sendo estes restritos a América do Sul (BRITSKI, 1972). O gênero *Hoplias* é o mais rico em número de espécies e de maior distribuição geográfica (VITORINO et al., 2007; ALMEIDA, 2010). Para a região sul e sudeste brasileiro, são citadas duas espécies: *H. malabaricus* e *H. lacerdae* que popularmente são conhecidas como traíras e trairões respectivamente, ambas com uma taxonomia confusa de tal maneira que são reconhecidos como complexos de espécies dos grupos *malabaricus* e *lacerdae* (MARIA, 2007).

A bacia do rio Iguaçu apresenta um alto grau de endemismo (KANTEK et al., 2007), porém devido à ação antrópica muitas espécies exóticas acabam sendo integradas a este ecossistema dificultando o estudo da biogeografia nativa (LEMOS et al., 2002).

Muitas contradições surgem sobre a real origem de *H. malabaricus* nesta bacia, e neste contexto a citogenética se torna uma ferramenta importante para estudos sobre estruturação genética e especiação.

Os primeiros trabalhos em *H. malabaricus* realizados por BERTOLLO e colaboradores (1978; 1983) com análise cromossômica convencional, já revelavam a grande diversidade cariotípica entre populações em relação a números diploides, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais. Este cenário pode ser explicado pelo fato de que, apesar de sua ampla distribuição geográfica, é uma espécie com limitada capacidade migratória, o que favorece a fixação de rearranjos cromossômicos nas populações.

Assim, frente a ampla variabilidade cariotípica é importante estabelecer que padrões desta espécie são encontrados no segundo planalto da bacia do Rio Iguaçu, centro-sul do Estado do Paraná. Adicionalmente diversos autores consideram *H. malabaricus* como um complexo de espécies distintas reunidas em uma única denominação específica e, portanto, justifica uma melhor revisão quanto a sua classificação. Desta maneira se torna fundamental compreendermos as variações cromossômicas que ocorrem com o táxon em diferentes bacias hidrográficas do Brasil, a fim de enriquecer a base de dados para estudos filogenéticos, taxonômicos e biogeográficos desta espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises citogenéticas foram realizadas em sete espécimes (três fêmeas e quatro machos) de *H. malabaricus* provenientes do Rio Iguaçu, município de Cruz Machado, Paraná. Os procedimentos utilizados estão de acordo com o Comitê de Ética in Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (processo No. 04741/08).

Preparações mitóticas foram obtidas por cultura de tecidos de curto tempo (FENOCCHIO et al., 1991). Detecção da heterocromatina constitutiva (Bandas C) foi realizada conforme SUMNER (1972) e as regiões organizadoras de nucléolo (RONS)

foram coradas por nitrato de prata (HOWELL e BLACK, 1980). Os cromossomos foram organizados por tamanho e morfologia de acordo com LEVAN et al. (1964), e agrupados dentro das categorias metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm). O número fundamental (NF), que reflete o número total de braços cromossômicos do cariótipo, foi determinado considerando que cromossomos metacêntricos e submetacêntricos são portadores de dois braços.

RESULTADOS

Todos os indivíduos coletados apresentaram um número diploide de 42 cromossomos distribuídos em 12 pares de cromossomos metacêntricos (m) e 9 pares submetacêntricos (sm), número fundamental (NF = 84) (Figura 1a). Não foi constatada a presença de cromossomos sexuais diferenciados morfologicamente.

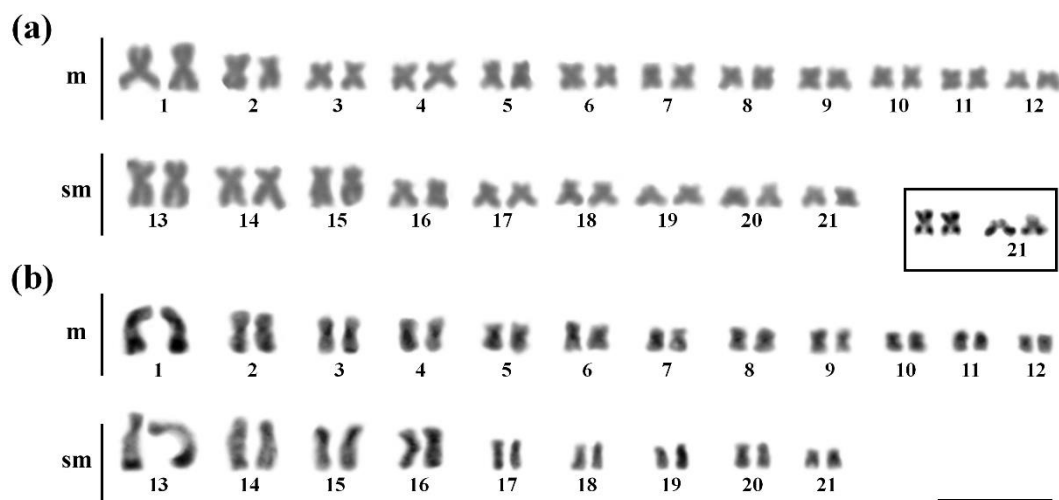


Figura 1. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* submetidos à coloração com Giemsa (a) e bandamento C (b). Cromossomos portadores das Ag-RONs (caixa). Barra = 5 µm.

Quanto à distribuição da heterocromatina constitutiva, o bandamento C evidenciou marcações centroméricas/pericentroméricas em todos os cromossomos, além de bandas teloméricas em alguns pares (Figura 1b).

A partir da impregnação com nitrato de prata, foi observado um padrão de RONS múltiplas, quando marcações foram evidenciadas em dois pares cromossômicos. Na região telomérica do braço longo dos menores cromossomos submetacêntricos (par 21) e em região telomérica de ambos os braços, caracterizando um padrão bitelomérico, em um par de cromossomos metacêntricos não identificado (Figura 1 caixa).

DISCUSSÃO

Os espécimes de *H. malabaricus* analisados no presente trabalho possuíram estruturas cariotípicas com $2n = 42$ cromossomos metacêntricos/submetacêntricos, cariótipo este correspondendo ao cariomorfo "A" descrito por BERTOLLO et al. (2000). Este cariótipo se caracteriza por apresentar uma estrutura estável, que não se diferencia morfológicamente entre machos e fêmeas e possui a maior distribuição no sul do Brasil (BERTOLLO et al., 2000; VICARI et al., 2003; MARIA, 2007). Quando analisado isoladamente, mesmo este cariomorfo apresenta uma variação interpopulacional quanto à morfologia dos cromossomos. Estudos realizados por BORN e BERTOLLO (2001) demonstraram grandes variações da fórmula estrutural do cariomorfo A, variando entre $(20m + 22sm)$, $(22m + 20sm)$ e $(24m + 18sm)$. Para a bacia do Rio Iguaçu, VICARI et al. (2003; 2005; 2006) e o presente estudo, apresentam a fórmula cariotípica para *H. malabaricus* igual a $24m + 18sm$. Tal polimorfismo é considerado estável e intrínseco à espécie, sendo o resultado de inversões pericêntricas alterando a morfologia dos cromossomos sem modificar, porém, o número diploide.

Dentro da bacia do Iguaçu, já foi também descrito o cariomorfo B em regiões restritas ao alto Rio Iguaçu (primeiro planalto paranaense) (LEMOS et al., 2002). Recentes estudos envolvendo marcadores cromossômicos mais resolutivos apontam para uma possível diferenciação do cariomorfo A originando o cariomorfo B. Este último possui uma estrutura cariotípica muito semelhante, com variações estritas à distribuição da heterocromatina constitutiva, regiões organizadoras de nucléolos e presença de um sistema sexual do tipo XX/XY, onde o cromossomo X corresponde ao único cromossomo subteloicêntrico deste cariótipo (BORN e BERTOLLO, 2001; CIOFFI e

BERTOLLO, 2010). A ocorrência dessa forma derivada permitiu relacionar a existência do cariomorfo B a partir de populações isoladas e que sua baixa ocorrência ao longo da bacia do Rio Iguaçu seja devida ao arco de Ponta Grossa ou arco Devoniano, barreira geológica natural entre o primeiro e segundo planaltos paranaenses (VICARI et al., 2006).

No Brasil as bacias costeiras do leste e nordeste sendo consideradas as mais antigas, representam um componente biogeográfico ancestral para muitos grupos de peixes (RIBEIRO, 2006), logo os cariomorfos existentes nelas podem representar o cariótipo basal dentro de *H. malabaricus*. O cariomorfo F ($2n = 40 \text{ m/sm}$), tem predominância em tais bacias (JACOBINA et al., 2009; DA ROSA et al., 2014), e assim ele seria plesiomórfico em relação a outros cariomorfos encontrados nas demais bacias, como a do Rio Iguaçu, que hospeda cariomorfos apomórficos, como o A e o B. Esta distribuição geográfica relacionada com a evolução cariotípica na família Erythrinidae pode também ser observada em *Hoplerythrinus unitaeniatus*, onde o grupo ancestral está distribuído ao longo das bacias litorâneas (DA ROSA et al., 2012).

Em relação à heterocromatina constitutiva, o padrão observado está de acordo com os encontrados em outras populações ou cariomorfos de *H. malabaricus* (BERTOLLO et al., 2000; BORN e BERTOLLO, 2001; VICARI et al., 2003; 2005; 2006), com bandas C centroméricas/pericentroméricas, e ocasionalmente em região telomérica. VICARI (2003) estudando *H. malabaricus* da região do alto Rio Iguaçu, relata um polimorfismo intrapopulacional balanceado de rDNA associado com heterocromatina no par submetacêntrico 16, com a presença de 3 fenótipos diferentes. Frente ao fato de que o cromossomo 16 do cariomorfo A tem correspondência em tamanho com o cromossomo X do cariomorfo B, tal DNA repetitivo desse segmento pode ter implicação na evolução do sistema sexual do cariomorfo B. Porém essa condição polimórfica não foi observada na população do presente estudo.

A coloração com nitrato de prata revelou RONS múltiplas sobre os menores cromossomos submetacêntricos, e uma marcação bitelomérica em um par metacêntrico. De acordo com BERTOLLO (1996) a ocorrência de RONS múltiplas é

frequente para a família Erythrinidae e o fenótipo bitelomérico é mais frequente nos cariomorfos A e B (VICARI et al., 2005). VICARI et al. (2006) ao analisar duas populações de *H. malabaricus* do Rio Iguaçu, observou a presença de duas a oito marcações, variação esta relacionada à dinâmica evolutiva dessa família gênica, caracterizada por recombinação desigual, atividade de elementos de transposição, rearranjos intra-cromossômicos, translocações, entre outros (FUJIWARA et al., 1998). A associação de RONS com heterocromatina constitutiva é um aspecto bastante relevante dentro da evolução cromossômica de *H. malabaricus*. CIOFFI et al. (2011) ao mapear algumas classes de DNA repetitivo verificou que tanto o cromossomo X quanto o Y do cariomorfo B aparentam apresentar homologia com o par 21 do cariomorfo A, uma vez que eles compartilham a ocorrência de genes de DNAr 45S, sequências (GATA)_n e sítios do DNA repetitivo 5SHindIII-DNA, reforçando assim a evidência de suas inter-relações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A população de *H. malabaricus* analisada no presente estudo apresentou o cariomorfo cuja distribuição é conhecida por ter a maior abrangência ao longo da bacia do Rio Iguaçu. Porém, frente ao fato de se tratar de um complexo de espécies, estudos cobrindo maiores áreas de amostragem são necessários para melhor compreender as possíveis transformações cariotípicas dentro do grupo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.B. **Diversidade molecular em espécies de trairões do complexo *Hoplias Lacerdae* (Teleostei: Erythrinidae)**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

BERTOLLO, L.A.C. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia** 61, p.75-81, 1996.

BERTOLLO, L.A.C; TAKAHASHI, C.S.; MORREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerda* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética** 1, p.103-120, 1978.

BERTOLLO, L.A.C; TAKAHASHI, C.S.; MORREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces: Erythrinidae). **Cytologia** 48, p.1-12, 1983.

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

BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n=42$ chromosomes. **Genetica** 110, p.1-9, 2001.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática**. In Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. São Paulo, p. 79-108, 1972.

CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity** 105, p.554-561, 2010.

CIOFFI, M.B.; CAMACHO J.P.; BERTOLLO, L.A.C. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research** 132(3), p.188-94, 2011.

DA ROSA, R.; RUBERT, M.; MARTINS-SANTOS, I.C.; GIULIANO-CAETANO, L. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 22, p.467-475, 2012.

DA ROSA, R.; VICARI, M.R.; DIAS, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L. New Insights into the Biogeographic and Karyotypic Evolution of *Hoplias Malabaricus*. **Zebrafish** 11(3), p.198-206, 2014.

FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia** 44, p.161-166, 1991.

FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKY, F.; YOSHIDA, M.C. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chromosome Research** 6, p.463-471, 1998.

HOWELL, W.M; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36, p.1014-1015, 1980.

JACOBINA, U.P.; AFFONSO, P.R.A.M.; CARNEIRO, P.L.S.; DERGAM, J.A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology** 7, p.617-622, 2009.

KANTEK, D.L.Z.; NOLETO, R.B.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçú River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50, p.67-74, 2007.

LEMOS, P.M.M.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; CESTARI, M.M. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçú river basin (Paraná State, Brazil). **Caryologia** 55(3), p.193-198, 2002.

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

LUNDBERG, J.G.; KOTTELAT, M; SMITH, M.L.J.; GILL, A.C. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 87, p.26-62, 2000.

MARIA, L. **Diversidade genética de *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (OSTARIOPHYSI, CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) no Rio Grande do Sul (BRASIL)**. Tese de doutorado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007.

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology** 4, p.225-246, 2006.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75, p.304-306, 1972.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. **Neotropical ichthyology: an overview. In Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** Edipucrs, Porto Alegre, p.1-12, 1998.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenetic and Genome Research** 101, p.24-28, 2003.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology** 28(1), p.103-110, 2005.

VICARI, M.R.; PAZZA, R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49, p.297-303, 2006.

VITORINO, C.A.; SILVA, L.P.; VENERE, P.C.; SOUZA, I.L. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias malabaricus* (traíra) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) do Médio Araguaia.** In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu MG. Resumos do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, v.1, 2007.