

Análise citogenética molecular de ciclídeos da região hidrográfica do Atlântico Sul

Molecular cytogenetical analysis of cichlids from the South Atlantic hydrographic region

RESUMO

Maíra Thais de Lima
maira_thais@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Vanessa Bueno da Silva
vanessab@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Cichlidae é uma diversa família de peixes, pertencente à ordem dos Perciformes. Com mais de 1.700 espécies válidas, são apreciados pela aquariofilia e aquicultura mundial. Estudos citogenéticos permitiram a observação de padrões na macroestrutura cromossômica deste grupo. No presente trabalho, uma espécie de ciclídeo foi analisada citogeneticamente, através de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares. Foi utilizada a coloração por Giemsa para determinação do número diploide e fórmula cariotípica, impregnação por nitrato de prata para a determinação das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e bandamento C para localização da heterocromatina constitutiva. Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para localizar os genes de DNAr 18S. Foi observado o número diploide de 48 cromossomos (6m + 2sm + 12st + 28a). As RONs foram localizadas no primeiro par metacêntrico, em posição intersticial. O bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos na região das RONs e na região centromérica de alguns cromossomos. A FISH permitiu a localização de sítios de DNAr 18S na mesma região em que as RONs foram observadas. Foi possível verificar que a macroestrutura cariotípica da espécie analisada assemelha-se a descrições de *Crenicichla*. Mais estudos são necessários para verificar os melhores marcadores citogenéticos para este grupo de peixes.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores Genéticos. Cromossomo. DNA ribossomal.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Cichlidae is a diverse fish Family that belongs to the Perciform order. With more than 1,700 valid species, they are appreciated by worldwide aquariophily and aquaculture. Cytogenetical studies allowed the observation of patterns in chromosome macrostructure of this group. In the present paper, a cichlid species was cytogenetically analyzed through classical and molecular cytogenetical techniques. Giemsa stain was used for the diploid number and karyotypic formula determination, silver impregnation was used for nucleolar organizer regions (NORs) determination, and c banding was used for constitutive heterochromatin localization. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to localize the 18S rDNA genes. The diploid number of 48 chromosomes (6m + 2sm + 12st + 28a) was observed. The NORs were localized in the first metacentric pair, in interstitial position. C banding evidenced heterochromatic blocks in the NORs and centromeric regions of some chromosomes. FISH allowed the localization of 18S rDNA genes in the same region NORs were observed. It was possible to verify that the chromosome macrostructure of the

analyzed species is similar to *Crenicichla* descriptions. More studies are needed to verify the best cytogenetical markers for this group of fish.

KEYWORDS: Genetic markers. Chromosome. Ribosomal DNA.

INTRODUÇÃO

Cichlidae é uma família de peixes que pertence a ordem Perciformes, Ordem esta constituída por 1.540 gêneros e cerca de 10.033 espécies, e integrantes com ampla distribuição (Ribeiro, 2007). Os ciclídeos contêm 1.723 espécies válidas e abundante diversidade (Eschmeyer; Fong, 2019).

Com base em análises filogenéticas, os Cichlidae podem ser divididos em 4 subfamílias: Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) com 1.100 espécies, Etroplinae (ciclídeos de Madagascar e sul da Ásia) com 16 espécies, Ptychochrominae (ciclídeos endêmicos da Ilha de Madagascar) com 15 espécies e Cichlinae (espécies americanas) com 550 espécies (Sparks; Smith, 2004). Esta família é amplamente pesquisada, pela rápida ambientação em lagos africanos e por serem muito utilizadas em aquarofilia e na aquicultura mundial, por possuir belas cores (Ferreira, 2009).

Na região Neotropical, local onde vivem exemplares da família Cichlidae, em torno de 60 gêneros (Ortiz, 2012), há vários comportamentos e especializações, com relação a estratégias tróficas e condições ambientais, onde a maioria das espécies tem como habitat rios e córregos, salvo algumas exceções; a alimentação se dá essencialmente por invertebrados, peixes e algumas plantas (Reis et al, 2003).

A citogenética de peixes, tem grande aplicação no que se relaciona a estudos evolutivos, pois com ela podemos examinar dados taxonômicos, genéticos e de comportamento, que nos proporcionam chegar a uma história evolutiva destes organismos (Artoni et al., 2000). Apesar da relevância para a aquicultura e estudos evolutivos, há poucas pesquisas sobre ciclídeos, dada sua grande diversidade de espécies existentes (Ferreira, 2009).

Os ciclídeos, apesar dos eventos de rearranjos cromossômicos durante sua história evolutiva, nota-se a manutenção de características cariotípicas basais dos Perciformes, compostos por 48 cromossomos subtelo-acrocêntricos e com RONS presentes em um único par cromossômico, apesar de ser encontrados em posições instáveis (Ribeiro, 2007).

Por meio de marcadores citogenéticos, é possível obter informações sobre caracteres populacionais, fórmulas cariotípicas, diferenciados sistemas de cromossomos sexuais, supranumerários, números e localização das RON (Regiões Organizadoras de Nucleolos), heterocromatina constitutiva, Bandamentos C, G e R e colorações com fluorocromos (Artoni et al., 2000).

Com o surgimento da genética e biologia molecular, é possível uma melhor compreensão da diversidade encontrada nos grupos e populações estudadas. Pela Hibridação Fluorescente in situ (FISH), foi possível localizar fisicamente nos

cromossomos, algumas sequências de DNA conhecidas como DNAr 5S e 18S. Além disso, a utilização de técnicas com fluorocromos com propriedades base-específicas, também são muito utilizadas para a citogenética molecular, um exemplo disso são a Cromomicina A3 (CMA3) e 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que tem a propriedade de identificar regiões ricas em Guanina-Citosina (CMA3) e Adenina-Timina (DAPI) (Ortiz, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho preveu a coleta de espécimes de ciclídeos da região hidrográfica do Atlântico Sul, mais precisamente na região de Águas Mornas, na bacia do Cubatão Sul. Uma vez que não foi possível realizar as coletas previstas no presente projeto, foi utilizado material disponível, de uma espécie de Cichlinae não identificada, proveniente de outros projetos realizados previamente.

As lâminas foram preparadas através da técnica de *air-drying*, onde a suspensão celular é pingada sobre uma lâmina limpa e seca ao ar. As lâminas foram coradas com Giemsa para análise citogenética básica, utilizada para a determinação do número diploide e fórmula cariotípica.

As Regiões Organizadoras de Nucléolo foram identificadas através de impregnação por nitrato de prata (Howell; Black, 1980). Para a determinação das regiões de heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica de bandamento C, com o tratamento da lâmina com uma solução ácida de ácido clorídrico, seguida pelo tratamento com uma solução de hidróxido de bário e uma solução salina (Sumner, 1972). As lâminas c-bandadas foram coradas com iodeto de propídeo.

A análise das lâminas foi realizada utilizando um fotomicroscópio de epifluorescência. Os cromossomos foram classificados segundo a metodologia descrita por Levan et al. (1964), que classifica a relação de braços (RB) onde esta medida compreende medir um braço do cromossomo (desde o centrômero) e depois o outro e o resultado da primeira média deve ser dividido pelo valor da segunda medida. Se o resultado dentre entre $RB = 1,00$ a $1,70$, é classificado como Metacêntrico; caso o resultado compreenda entre $RB = 1,71$ a $3,00$, é categorizado como Submetacêntrico; se for de $RB = 3,01$ a $7,00$, será identificado como Subtelocêntrico; e se a medida compreender $RB =$ maior que $7,01$ será Acrocêntrico.

Foi realizada a hibridização in situ com sondas fluorescentes (FISH), com sondas de 18S e 5S. A FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi observado o número diploide de 48 cromossomos para machos e fêmeas, com $6m + 2sm + 12st + 28a$, número compatível com o observado para ciclídeos neotropicais (Ferreira, 2009). A fórmula cariotípica observada é muito próxima da observada para *Crenicichla lepidota* ($6m-sm + 42st-a$), assim como a macroestrutura cromossômica, com destaque para a conspicua constrição secundária no maior par de cromossomos m/sm (Poletto et al., 2010).

As AgRONS foram simples, com marcação intersticial no braço curto do maior par de cromossomos metacêntricos. AgRONS simples são observadas para um grande número de ciclídeos neotropicais, como *C. lepidota*, *Retroculus lapidifer*, *Astronotus ocellatus*, entre outros. Esta característica pode ser observada mesmo em ciclídeos africanos, o que indica que pode tratar-se de uma característica ancestral (Feldberg; Bertollo, 1985; Poletto et al., 2010).

O bandamento C marcou fortemente a região das Ag-RONS, além da região centromérica de alguns pares de cromossomos, porém não foi possível identificar marcações conspícuas que pudessem auxiliar na identificação de pares específicos.

A hibridização in situ foi realizada com as sondas de DNAr 5S e 18S. Não foi possível identificar marcações com a sonda de DNAr 5S, possivelmente por problemas na manutenção da sonda de DNAr. A hibridização com sondas de DNAr 18S resultou na marcação de um cromossomo metacêntrico, em posição intersticial do braço curto. Esperava-se que fossem observadas duas marcações, coincidentes com as marcações das RONS. Uma vez que a hibridização in situ é uma técnica de marcação direta das sequências de DNA ribossomal, o não aparecimento da segunda marcação não está relacionado à atividade transcricional da região, o que pode acontecer no caso da marcação por impregnação por nitrato de prata. Neste caso, a segunda marcação não pode ser encontrada provavelmente por problemas com a conservação da sonda ou vestígios na realização da técnica.

A marcação de um par de cromossomos na hibridização in situ com DNAr 18S é comumente observada em ciclídeos, tanto neotropicais quanto africanos, sugerindo uma característica ancestral no grupo. Porém, sítios múltiplos já foram reportados em algumas espécies. Além disso, espécies basais de Cichlinae apresentam sítios de DNAr 18S em posição terminal do cromossomo (Poletto et al., 2010; Paiz et al., 2017).

CONCLUSÃO

Embora a espécie analisada ainda não tenha sido identificada através de análises morfológicas, suas características citogenéticas demonstram uma forte semelhança com uma espécie de *Crenicichla* já analisada. Essa semelhança pode ser um indício de que a espécie pertença a esse gênero. As características cromossômicas dos ciclídeos são consideradas conservadas dentro do grupo. Mesmo assim, foi possível verificar que alguns marcadores, como a localização dos sítios de DNAr localizados por FISH ou impregnação por nitrato de prata, podem ser utilizados no estudo da diversificação do grupo. A macroestrutura cariotípica também se mostrou interessante para estudos taxonômicos mais amplos, porém mais resultados são necessários para verificar os melhores marcadores citogenéticos para o grupo dos ciclídeos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa de pesquisa, a UTFPR por ceder o espaço, a minha orientadora Vanessa Bueno da Silva, por todas as orientações, aos meus companheiros de laboratórios e ao grupo GEIN.

REFERÊNCIAS

- ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. Citogenética de peixes neotropicais: Métodos, resultados e perspectivas. **Publicatio UEPG**, v. 6, p. 44-54. 2000.
Disponível em:
<https://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica/article/viewFile/257/261>.
Acesso em: 15 ago. 2019
- ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Species by family/subfamily. In: Eschmeyer, W. N. (Ed.). **Catalog of fishes**. California, California Academy of Sciences. Online version.
Disponível em:
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia**. v. 38, p. 319-324. 1985.
Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/261677644_Nucleolar_Organizing_Regions_in_Some_Species_of_Neotropical_Cichlid_Fish_Pisces_Perciformes. Acesso em: 15 ago. 2019.
- FERREIRA, I.A. **Mapeamento cromossômico comparativo em peixes Cíclídeos utilizando sequências repetitivas de DNA**. 2009. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. Disponível em:
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102687> . Acesso em: 15 ago. 2019.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015. 1980. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01953855> . Acesso em: 15 ago. 2019.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220. 1964. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/227998984_Nomenclature_for_Centromeric_Position_on_Chromosomes . Acesso em: 15 ago. 2019.
- ORTIZ, R.J. **Características Espermáticas na subfamília Cichlinae (Perciformes: Cichlidae) e suas implicações filogenéticas**. 2012. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012. Disponível em:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100519/ortiz_rj_dr_botib.pdf?sequence=1&isAllowed=y . Acesso em: 15 ago. 2019.
- PAIZ, L.M. BAUMGÄRTNER, L.; GRAÇA, W.J.; MARGARIDO, V.P.; PAVANELLI, C.S. Cytogenetics of *Gymnogeophagus setequedas* (Cichlidae: Geophaginae), with

comments on its geographical distribution. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, e160035. 2017. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252017000200211 . Acesso em: 15 ago. 2019.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC323421/> . Acesso em: 15 ago. 2019.

POLETTI, A.B.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; NAKAJIMA, R.T.; MAZZUCHELLI, J.; RIBEIRO, H.B.; VENERE, P.C.; NIRCHIO, M.; KOCHER, T.D.; MARTINS, C. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. **BMC Genetics**, v. 11, p. 50-61. 2010. Disponível em:
<https://bmcbgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-11-50> . Acesso em: 15 ago. 2019.

REIS, D.A.R. **Estudos Citogenético-Moleculares em Espécies do Gênero *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds) **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre. 2003. Disponível em:
<https://www.nrm.se/download/18.bb3f71108335b4bcd80003241/> . Acesso em: 15 ago. 2019.

RIBEIRO, H.B. **Estrutura e Evolução cariotípica de peixes Ciclídeos Sul Americanos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

SPARKS, J.S.; SMITH W.L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**, v. 20, p. 501-517. 2004. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1096-0031.2004.00038.x> . Acesso em: 15 ago. 2019.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306. 1972. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482772905587?via%3DiHub> . Acesso em: 15 ago. 2019.