

Caracterização citogenética de uma população de *Astyanax bimaculatus*

Cytogenetic characterization of a population of *Astyanax bimaculatus*

RESUMO

Alex Sandro Sausen
alexsausen@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Santa Helena, PR,
Brasil

Daniel Rodrigues Blanco
danielrblanco@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Santa Helena, PR,
Brasil

Heleno Brandão
helenob@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Santa Helena, PR,
Brasil

João Carlos Maicrovicz
joacarlosmaicrovicz@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Santa Helena, PR,
Brasil

Natália Lima Lira
natalia.2016@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Santa Helena, PR,
Brasil

Sandro Tonello
sandrotonello@gmail.com
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Cascavel, PR, Brasil

Este trabalho propõe a caracterização citogenética, por metodologias clássicas (coloração por Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata), de uma população de *Astyanax bimaculatus* oriunda de um tributário do lago de Itaipu, na região do município de Santa Helena – PR, e compará-los com espécies já descritas. As dificuldades na identificação e determinação de relações filogenéticas ocorrem devido às espécies crípticas do gênero *Astyanax*, que acabam sendo agrupadas em táxons polifiléticos, como o grupo *Astyanax bimaculatus*, formado por aproximadamente 22 espécies e subespécies. Foram coletados e analisados 4 exemplares do grupo *A. bimaculatus*, sendo dois machos e duas fêmeas onde foi encontrado o número diploide $2n = 50$ cromossomos tanto em machos, quanto em fêmeas. As análises do padrão de distribuição da heterocomatina, a maioria dos estudos tem evidenciado padrões de distribuição centroméricos, teloméricos e intersticiais proximais, na população estudada, encontra-se nas regiões centroméricas de seis pares de cromossomos e terminais em outros dois pares. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs), neste estudo, mostraram um padrão simples de marcação, na região terminal do braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos, diferente do padrão geralmente encontrado em outros estudos do grupo.

PALAVRAS-CHAVE: Cromossomo. Characiformes. Lago de Itaipu.

ABSTRACT

This work proposes the cytogenetic characterization, by classical methodologies (staining by Giemsa, C band and silver nitrate impregnation), of a population of *Astyanax bimaculatus* from a tributary of the Itaipu lake, in the region of the municipality of Santa Helena - PR, and compare them with species already described. The difficulties in the identification and determination of phylogenetic relationships occur due to the cryptic species of the genus *Astyanax*, which end up being grouped into polyphyletic taxa, such as the *Astyanax bimaculatus* group, formed by approximately 22 species and subspecies. Four specimens from the group *A. bimaculatus* were collected and analyzed, two males and two females where the diploid number $2n = 50$ chromosomes was found in both males and females. Analyses of the heterocomatin distribution pattern, most studies have shown proximal centromeric, telomeric and interstitial distribution patterns, in the studied population, is found in the centromeric regions of six pairs of chromosomes and terminals in two other pairs. The nucleolus organizing regions (NORs), in this study, showed a simple pattern of

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.



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



marking in the terminal region of the short arm on a pair of submacentric chromosomes, different from the pattern generally found in other studies of the group.

KEYWORDS: Chromosome. Characiformes. Itaipu lake.

INTRODUÇÃO

Os peixes representam um grupo interessante para estudos da variabilidade genética e processos evolutivos por se encontrarem numa posição basal na filogenia e por ser um grupo muito diversificado. Deste modo, devido ao aumento dos estudos de sistemática e filogenia, muitos grupos, tem aumentado o número de espécies descobertas, em contrapartida, devido a descrições errôneas e descoberta de sinônimas, alguns grupos tem diminuído (NELSON, 2006).

Para um melhor entendimento das relações evolutivas entre populações de peixes, ferramentas como a citogenética, tem sido fundamentais, além de auxiliar na caracterização e diferenciação de espécies similares, quando associado com dados de comportamento, biologia, biogeografia e dados morfológicos (PRIOLI et al., 2002; MATOSO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009)

Astyanax é um taxon polifilético com diversas espécies e distribuição desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina. São peixes de pequeno porte, popularmente conhecidos como lambaris ou piabas (LIMA et al., 2003; ESCHMEYER & FONG 2015). Devido à grande semelhança entre as espécies e delimitações taxonômicas pouco detalhadas torna difícil a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas dentro do gênero (MELO, 2001; MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Para resolver problemas de ordem taxonômica, evolutiva e ecológica a citogenética é uma excelente ferramenta. O grupo *Astyanax bimaculatus* formado por aproximadamente 22 espécies e subespécies caracterizadas pela presença de uma mancha umeral negra e horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons e uma mancha negra no pedúnculo caudal (LUCENA & SOARES, 2016).

A utilização de marcadores cromossômicos possibilita a análise de possíveis homeologias, além de possibilitar a verificação de divergências citogenéticas interespecífica em unidades biológicas morfológicamente semelhantes (espécies crípticas). Análises cromossômicas e morfológicas sugerem que o grupo *A. bimaculatus* pode conter aproximadamente 22 espécies (LUCENA & SOARES, 2016). Outrossim, a identificação de diferenças cromossômicas pode auxiliar na elucidação de problemas de ordem taxonômica e evolutiva.

O gênero *Astyanax* é considerado um dos mais diversos dentro da família Characidae. Apresentam uma grande variação cromossômica (TENORIO, 2013), sendo que a maioria apresenta o número diploide ($2n$) de 50 cromossomos, mas podendo variar de 36 cromossomos, como em *A. schubarti* (DANIEL-SILVA, 2005) à $2n = 50$ como acontece com *A. scabripinis* (CASTRO, 2015), além disso, para auxiliar na diferenciação das espécies, apresenta variação nas fórmulas cariotípicas (GAVAZZONI et al., 2018).

Em diversos grupos de peixes, assim como também em *Astyanax* a variabilidade da posição de blocos heterocromáticos e de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) é útil para compreender o processo de evolução e diferenciação de cariótipo ((MARGARIDO & GALETTI-JR., 2000; MANTOVANI et al., 2004). No gênero *Astyanax* encontramos variações do número fundamental, na fórmula cariotípica e regiões organizadoras de nucléolo, polimorfismos de heterocromatina, casos de triploidia além de ocorrência de cromossomos B (MORELLI et al., 1983; KAVALCO et al., 2007; MACHADO et al., 2012).

METODOLOGIA

Coletas

Os espécimes de *Astyanax* foram coletados no Córrego São Gabriel (24°56'47.0"S 54°19'00.0"W), com auxílio de redes e/ou tarrafas (Licença permanente SISBIO 38532-2), levados vivos para o laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Santa Helena, e mantidos em aquários aerados. Posteriormente, os mesmos foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000) para retirada de tecidos para preparações citogenéticas.

Os animais coletados foram depositados na Coleção de Ictiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Santa Helena, como material testemunho. O presente Trabalho de Iniciação Científica está vinculado ao projeto intitulado “Caracterização citogenética e do DNA mitocondrial em espécies de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* (Characiformes, Characidae) de pisciculturas da região do Lago de Itaipu e seus impactos sobre a espécie nativa *A. altiparanae*” que possui autorização de execução do Comitê de Ética no Uso de Animais da UTFPR (Protocolo CEUA: 2018-5).

Análises Citogenética

Obtenção de mitoses por tratamento “in vivo”:

Para a obtenção de metáfases mitóticas utilizou-se o rim anterior, uma vez que este possui função hematopoiética. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Foresti et al. (1993). Injetou-se, intra-abdominalmente, no animal uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso vivo. Após a injeção o poixe foi mantido em aquário bem arejado por aproximadamente uma hora. Decorrido esse tempo sacrificou-se o animal para retirar a parte anterior do rim. O material obtido foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), e transferido para pequenas cubas de vidro contendo aproximadamente 10 ml desta mesma solução. Fragmentou-se o material com auxílio de pinças de dissecação e com seringas hipodérmicas, sem agulha, através de repetidos movimentos de aspiração e expiração do material, até obter uma suspensão celular homogênea. A solução obtida foi incubada por 20 minutos a temperatura de 36 a 37°C. Na sequência o material foi cuidadosamente suspenso com auxílio de uma pipeta Pasteur, e esta suspensão finalmente transferida para um tubo de centrífuga. Acrescentou-se algumas gotas de fixador (metanol; ácido acético – 3:1) ao material o qual foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm. O material sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Adicionou-se novamente de 5 a 7 ml de fixador,

deixando escorrer vagarosamente através das paredes do tubo. Homogeneizou-se novamente o material. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do material sobrenadante, adicionou-se 1ml de fixador e o material foi guardado em freezer, em pequenos frascos tipo “Ependorf” para posterior utilização.

Para se determinar o número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa e análise em microscópio óptico. Alternativamente, quando houver necessidade de processamento em campo, será utilizado a técnica descrita por Blanco et al. (2012), que consiste em dissociar o rim anterior em meio hipotônico e posteriormente promover a fixação e armazenar, sendo que a finalização do processo de obtenção se dá após o retorno ao laboratório.

Preparo de lâminas:

1- Pingar 1-3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, aquecida entre 55 e 60°C, deixando-a secar ao ar.

2- Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$), pH=6,8, por 7 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de impregnação por prata, bandamento-C ou hibridização in situ.

Deteção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (AgNORs):

Regiões Organizadoras de Nucléolos são sítios de rDNA responsáveis pela síntese dos RNA ribossômicos. Entre as técnicas atualmente mais utilizadas para detecção das NORs está a de coloração pela prata. Estudos têm demonstrado que esta técnica evidencia apenas as NORs que estavam ativas na intérfase precedente. Foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980).

Para preparar esta técnica utiliza-se 2 soluções: gelatina 2% que é a diluição de 2g de gelatina em 100 mL de água deionizada, e adiciona-se 1 mL de ácido fórmico PA e solução de nitrato de prata 50% que consiste na dissolução de 4g de Ag-NOR em 8 mL de água deionizada.

O preparo da lâmina consiste em pingar duas gotas da solução de gelatina sobre uma lâmina já preparada com o material genético a ser estudado, e sobre estas gotas de gelatina mais duas gotas da solução de nitrato de prata 50%. Após isso a lâmina é coberta com a lamínula e levada a estufa, para secagem, até atingir a cor caramelo, quando é retirada da estufa e escorrida em água corrente, e finalmente colocada para secar ao ar.

Deteção da distribuição da heterocromatina:

Conhecida por conter genes que não são expressos, a heterocromatina é uma região condensada do cromossomo e é utilizada para preparar os cromossomos homólogos na montagem do cariótipo.

Para a detecção de heterocromatina (bandas-C), foi utilizada técnica convencional de hidróxido de bário (SUMNER, 1972), com modificações na coloração que foi feita com iodeto de propidium (LUI et al., 2012).

A técnica consiste na utilização de hidróxido de bário (BaOH) a 5% que rompe a ligação pentose-fosfato do nucleotídeo e Ácido clorídrico (HCl) 0,2N para depuração, causando modificações na etapa de coloração.

Estudos cariotípicos:

As preparações (Giemsa, banda-C e AgNORs) foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, em aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX53 com câmera digital QColor5M. A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan et al. (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st);

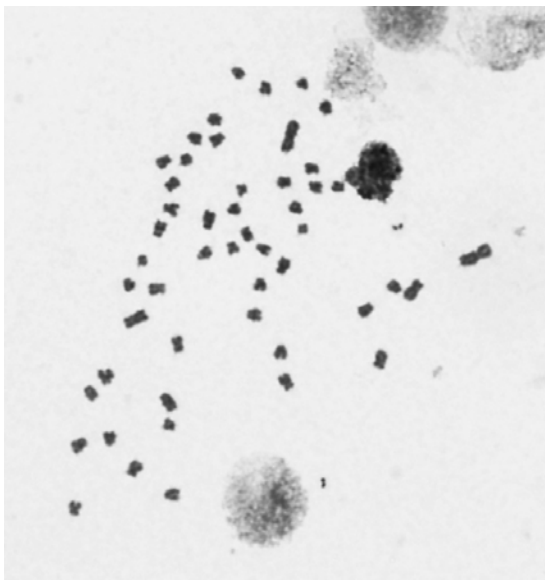
RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados portadores de 2 braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos, com somente 1 braço.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram coletados e analisados 4 exemplares do grupo *A. bimaculatus*, sendo dois machos e duas fêmeas. Nos exemplares de *A. bimaculatus* estudados foi encontrado o número diploide $2n = 50$ cromossomos tanto em machos, quanto em fêmeas, evidenciando ausência de cromossomos sexuais heteromórficos (Fig. 1).

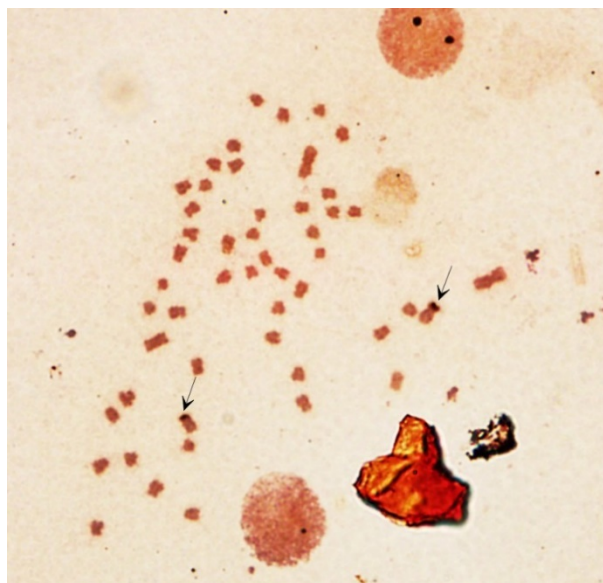
Figura 1 - Metáfase de exemplar de *Astyanax bimaculatus* corado com Giemsa.



Fonte: próprio autor

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs), reveladas pelo nitrato de prata, mostraram um padrão simples de marcação, na região terminal do braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos, tanto em machos quanto em fêmeas (Fig. 2).

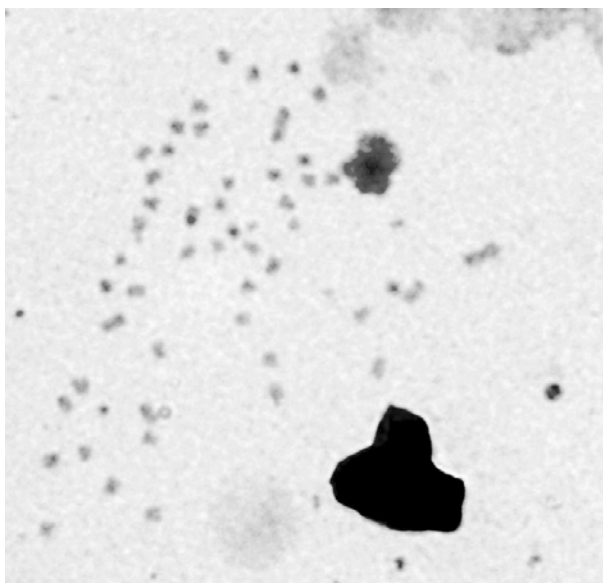
Figura 2 - Metáfase de *Astyanax bimaculatus* com impregnação de nitrato de prata (Ag-NOR). As setas indicam as marcações por impregnação.



Fonte: próprio autor

Os resultados encontrados pela técnica de Banda C evidenciaram um padrão de distribuição da heterocromatina nas regiões centroméricas de seis pares de cromossomos e terminais em dois pares de cromossomos (Fig.3). É pertinente ressaltar que o padrão de distribuição heterocromático encontrado no presente trabalho manteve-se constante tanto em machos quanto em fêmeas.

Figura 3 - Metáfase de *Astyanax bimaculatus* C bandada



Fonte: próprio autor

DISCUSSÃO

As espécies alocadas no gênero *Astyanax* apresentam vasta complexidade cromossômica (TENORIO, 2013), variando seu número diploide ($2n$) de 36 cromossomos, encontrado em *A. schubarti* (DANIEL-SILVA, 2005), à $2n=50$ em *A. scabripinis* (CASTRO, 2015), sendo que a maioria das espécies analisadas de *Astyanax* apresenta $2n=50$, levando em conta também as muitas variações nas fórmulas cariotípicas encontradas (GAVAZZONI et al., 2018).

As análises citogenéticas da população estudada revelou um número diploide de 50 cromossomos, número este comumente encontrado em espécies do grupo *A. bimaculatus*, (GAVAZZONI et al., 2018) podendo, assim, representar uma característica plesiomorfia do grupo.

Em relação às análises do padrão de distribuição da heterocromatina (bandamento-C) de espécies de *A. bimaculatus* a maioria dos estudos tem evidenciado padrões de distribuição centroméricos, teloméricos e intersticiais proximais (GAVAZZONI et al., 2018), na população estudada a distribuição da heterocromatina se encontra nas regiões centroméricas de seis pares de cromossomos e terminais em outros dois pares. Estas variações no número e posição das bandas heterocromáticas sugerem que este marcador pode ser relevante em estudos populacionais e até mesmo interespecíficos.

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs), evidenciadas pela impregnação com nitrato de prata, neste estudo, mostraram um padrão simples de marcação, na região terminal do braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos, diferente do padrão geralmente encontrado em outros estudos do grupo *A. bimaculatus* que as encontram em cromossomos acrocêntricos (GAVAZZONI et al., 2018). Esta diferença pode ser atribuída a rearranjos robertsonianos do tipo inversão pericêntrica incluindo o sítio de NOR. Vale ressaltar que a impregnação por nitrato de prata evidencia somente as Regiões Organizadoras de Nucléolo ativas em uma intérfase anterior necessitando, assim, de confirmação por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S para precisão no número de sítios.

CONCLUSÕES

A população analisada apresenta número diploide de 50 cromossomos, porém com variações no padrão de distribuição da heterocromatina e nas regiões organizadoras de núcleo em relação a outros estudos. Devido a variação de distribuição da heterocromatina este marcador pode ser utilizado em futuros estudos para uma melhor diferenciação das espécies dentro do grupo *A. bimaculatus*.

REFERÊNCIAS

BLANCO, D.R.; BERTOLLO, L.A.C.; LUI, R.L.; VICARI, M.R.; MARGARIDO, V.P.; ARTONI, R.F. & MOREIRA-FILHO, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fish in the field. *Journal of Fish Biology* 81: 351-357.

CASTRO, J. P., MOURA, M. O., MOREIRA-FILHO, O., SHIBATTA, O. A., SANTOS, M. H., NOGAROTO, V., VICARI, M. R., ALMEIDA, M. C., ARTONI, R. F. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 25:231-244. 2015.

CAVALLINI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. (1988). Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Maringá, Pr. P.32.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenetic Genome Research* 109:497-501. 2005.

ESCHMEYER, W.N. & FONG, J.D. (2015). Species by family/subfamily. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 23/05/2020.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicines. *Experientia* 49: 810-813.

GAVAZZONI, M., PAIZ, L. M., OLIVEIRA, C. A. M., PAVANELLI, C. S., GRAÇA, W. J., MARGARIDO, V. P. Morphologically Cryptic Species of the *Astyanax bimaculatus* "Caudal Peduncle Spot" Subgroup Diagnosed Through Cytogenetic Characters. *ZEBRAFISH*. DOI: 10.1089/zeb.2018.1574. 2018.

GRIFFITHS, S.P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57: 1453–1464.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 6: 1014-1015.

KAVALCO, K. F., PAZZA, R., BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA-FILHO, O. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 30: 320-335. 2007.

LIMA, F. C. T., MALABARBA, L. R., BUCKUP, P. A., SILVA, J. F. P., VARI, R. P., HAROLD, A., et al. (2003). Genera Incertae sedis in Characidae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris-Jr, C. J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (pp. 106-169). Porto Alegre: Edipucrs.

LUCENA, C. A. S. & SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the Rio La Plata and Rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa* 4072: 101-125. 2016.

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MARGARIDO, V.P. & MOREIRA FILHO, O. (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438.

MACHADO, N. S., FERREIRA-NETO, M., BAKKALI, M., VICARI, M. R., ARTONI, R. F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia* 65: 40-46. 2012.

MANTOVANI, M., ABEL, L. D. S., MESTRINER, C. A. & MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 536-542. 2004.

MARGARIDO, V. P. & GALETTI-JR, P. M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 569-573. 2000

MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. & GALETTI-JR., P.M. (2004). Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527: 223-225.

MELO, F.A.G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivo Museu Nacional do Rio de Janeiro* 59:1-46.

MIRANDE, J.M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8: 385-568.

MORELLI, S., BERTOLLO, L. A. C., FORESTI, F., MOREIRA-FILHO, O., TOLEDO-FILHO, S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotype variability. *Caryologia*, 36:3, 235-244. 1983.

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

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. & HILSDORF, A.W.S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:81-100.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.S.; ABE, K.T.; MARIGUELA, T.C.; BENINE, R.C.; ORTÍ, G.; VARI, R.P. & CORRÊA-E-CASTRO, R.M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11:275.

PRIOLI, S. M. A. P., PRIOLI, A. J., JÚLIO-JR, H. F., PAVANELLI, C. S., OLIVEIRA, A. V. & CARRER, H., et al. (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25:4, 421-430.

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

TENÓRIO, R. C. C. O., VITORINO, C. A., SOUZA, I. L., OLIVEIRA, C., VENERE, P. C. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11:553-564. 2013.