

Obtenção de marcadores cromossômicos clássicos e moleculares em *Astyanax laticeps* (Characiformes, Characidae).

Attainment of classic and molecular chromosome markers in *Astyanax laticeps* (Characiformes, Characidae).

RESUMO

Marcos Vinícius Pupo
marcospupo@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brazil

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

Natalia Lira Lima
natalia.limalira@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brazil

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

João Carlos Maicrovicz
joaocarlosmaicrovicz@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brazil

Helena Brandão
helenob@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brazil

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.



O táxon polifilético *Astyanax* compreende espécies com formas semelhantes e taxonomia pouco detalhada. Este trabalho teve como objetivo caracterizar, por meio de metodologias citogenéticas clássicas (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata – Ag-NORs) e realizar um mapeamento físico dos genes ribossomais 5S e 18S moleculares (Double FISH), através de exemplares de *Astyanax laticeps* oriundos de Esquina Céu Azul, Santa Helena, Paraná. O número diploide analisado foi de 50 cromossomos (8m+24sm+6st+12a, FN=88), igualmente distribuídos entre sexos. O Bandamento C demonstrou blocos de heterocromatina com marcação conspícua em poucos pares de cromossomos, com presença de heterocromatina localizada predominantemente na região terminal do braço longo em três cromossomos, correspondendo com as NORs. Foram observados cístrons simples de rDNA 5S conservados na região intersticial de um par cromossômico metacêntrico. As marcações por sonda de rDNA 18S revelaram cístrons constantes nas regiões terminais do braço curto de um par subteloentrico e uma terceira marcação em um único cromossomo, indicando ocorrência de sítios múltiplos para este marcador devido a possível deleção, transposição entre homólogos ou *crossing* desigual. O estudo é prévio, porém fornece dados importantes na elucidação de questões de ordem taxonômica e evolutiva em *Astyanax laticeps*.

PALAVRAS-CHAVE: Lambari. Citogenética. FISH.

ABSTRACT

The polyphyletic taxon *Astyanax* comprises species with similar shapes and little described taxonomy. This project aimed to characterize, by means of classic cytogenetic methodologies (conventional staining by Giemsa, C-banding and silver nitrate impregnation - Ag-NORs) and to perform a physical mapping of the 5S and 18S molecular ribosomal genes (Double FISH), using samples of *Astyanax laticeps* from Esquina Céu Azul, Santa Helena, Paraná. The diploid number analyzed was 50 chromosomes (8m+24sm+6st +12a, FN=88), equally distributed between male and female genders. The C-Banding demonstrated heterochromatin blocks with conspicuous marking on a few pairs of chromosomes, with the presence of heterochromatin located predominantly in the terminal region of the long arm on three chromosomes, corresponding to the NORs. Simple cistrons of 5S rDNA were observed in the interstitial region of a metacentric chromosome pair. The 18S rDNA probe markings revealed constant cistrons in the terminal regions of the short arm of a



subtelocentric pair and a third mark on a single chromosome, indicating the occurrence of multiple sites for this marker due to possible deletion, transposition between homologues or uneven crossing. This study is previous, but expands the knowledge regarding the *Astyanax laticeps* complex.

KEYWORDS: *Lambari*. Cytogenetics. FISH.

INTRODUÇÃO

O grupo *Astyanax*, que abrange os peixes de pequeno porte popularmente conhecidos como piabas ou lambaris, é considerado um dos grupos mais ricos em espécies de Characidae, possuindo cerca de 150 espécies válidas distribuídas do Sul dos Estados Unidos à região Central da Argentina (LIMA, 2003; ESCHMEYER, 2016), com alta representatividade nos sistemas hidrográficos brasileiros. Atualmente, tem sido registrada em drenagens costeiras do Uruguai e do Brasil até o sul do Paraná, na bacia do Rio Uruguai, também na bacia Atlântica do Paraná e do Rio Ribeira de Iguape, onde inclusive era identificado como *A. janeiroensis* (AZPELICUETA; LOUREIRO, 2009; BERTACO & LUCENA, 2010). O grupo é considerado um dos mais ativos em termos de descrição de novas espécies (ESCHMEYER, 2016) e graças aos significativos esforços da taxonomia, sistemática e da genética alguns problemas taxonômicos estão sendo resolvidos (OLIVEIRA et al, 2011; MIRANDE & KOERBER, 2015). Contudo, apesar dos inúmeros estudos, ainda existem dúvidas em relação à sistemática de certos grupos dentro do gênero.

Atualmente é considerado um táxon polifilético que compreende espécies com formas bastante semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas, o que dificulta a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas dentro do gênero (MIRANDE, 2010; MIRANDE & KOERBER, 2015). Apresenta espécies morfológicamente crípticas e alguns complexos de espécies (grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares), cujas filogenias nunca foram testadas. Entre estes complexos de espécies estão: complexo *Astyanax paranae* Eigenmann 1914, *A. bimaculatus* Linnaeus 1758, *A. scabripinnis* Jenyns 1842, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* Garutti & Britski 2000 (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2004; ARTONI et al, 2006; PAZZA, 2006).

Ferramentas como a citogenética e genética molecular têm contribuído significativamente para um melhor entendimento das relações evolutivas entre populações e espécies de peixes, além de auxiliar na caracterização e diferenciação de espécies similares, principalmente quando associados com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia (PRIOLI, 2002; MATOSO, 2004; OLIVEIRA, 2009). Os estudos citogenéticos apresentaram grandes avanços nos últimos anos, em virtude principalmente da utilização de novas técnicas para análise cromossômica, possibilitando uma contribuição muito mais eficaz não apenas para os estudos taxonômicos e filogenéticos, mas também para melhor compreensão da estrutura cromossômica. Estes avanços têm impactado os estudos citogenéticos de peixes, resultando numa expansão rápida no número de espécies estudadas nos últimos anos (OLIVEIRA, 2011).

Desta forma, o presente projeto teve como objetivo caracterizar, por meio de metodologias clássicas de Citogenética (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata – Ag-NORs) exemplares oriundos da região do distrito de Esquina Céu Azul em Santa Helena-PR. O presente trabalho 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).

METODOLOGIA

Coleta: Foram coletados no distrito de Esquina Céu Azul (24°54'47,91"S 54°17'35,82"W) 8 espécimes de *Astyanax laticeps* (Figura 1), sendo 4 machos e 4 fêmeas, com auxílio de redes e tarrafas (Licença permanente SISBIO 38532-3) e levados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Santa Helena, onde foram mantidos em aquários aerados. Os indivíduos foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo na concentração de 100mg/L [30][31] para retirada dos tecidos para as análises 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 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).

Figura 1 – Exemplar de *Astyanax laticeps* coletado.



Fonte: Autoria própria (2020).

Preparação de cromossomos mitóticos – Tratamento “in vitro”: Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Foresti et al. (1993), que consiste na obtenção de metáfases mitóticas a partir de fragmentos do rim cefálico, uma vez que este possui função hematopoiética. Este, foi colocado em 10 mL de solução salina de Hanks, sendo o material bem dissociado. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, foram adicionadas de 1 – 2 gotas de solução de Colchicina 0,016 %, misturando-a bem com o material. Posteriormente, o material foi então transferido para estufa a 36 °C, por 30 minutos e, em seguida, centrifugado durante 10 minutos, a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e ao restante do material foram adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando bem o material com uma pipeta de Pasteur. Esse material voltou para estufa a 36 °C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético, na proporção de 3:1) misturando-as com o material repetidas vezes. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado novamente e, em seguida, adicionado 10 mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes, que em seguida foi levado à centrifuga por mais 10 minutos a 1100 rpm. Essa etapa foi então repetida por mais duas vezes. O material fixado foi acondicionado em tubos de microcentrifuga tipo “Eppendorf” e armazenados em freezer, para posterior análise.

Preparo de lâminas: Gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina limpa, levemente aquecida, deixando-a secar ao ar. Se tratando das análises de quantidade e morfologia dos cromossomos, a lâmina foi corada 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.

Bandamento C (SUMNER, 1972): As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2 N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5 % a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2 N, em água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60 °C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado 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.

Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos - Ag-NORs (HOWELL & BLACK, 1980): Sobre a lâmina com cromossomos foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de gelatina (1 g/100 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50 %). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em estufa a 60 °C por um período de aproximadamente três minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da mesma. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e corada com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8).

Dupla hibridização in situ fluorescente - Double FISH (PINKEL et al., 1986): Através da dupla hibridização in situ fluorescente (Double-FISH), os cístrons de rDNAs 5S e 18S nos cromossomos foram mapeados. Para identificação das localizações de rDNA 18S e 5S foram utilizadas sondas de *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae), obtidas por Hatanaka e Galetti Jr. (2004) e de *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae) obtidas por Martins e Galetti Jr. (1999), respectivamente.

A sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Dig Nick Translation Kit – Sigma-Aldrich®). A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina-16-dUTP, através da técnica de *nick translation* de acordo com o fabricante (Biotin Nick Translation Kit - Sigma-Aldrich®). Os cromossomos metafásicos foram tratados com RNase a 37°C e desnaturados em NaOH 0,05N/2xSSC. A solução de hibridização foi composta de 6 µL da sonda 18S rDNA e 6 µL sonda 5S rDNA; 6 µL de 20xSSC; 30 µL de formamida 50% e 12 µL de sulfato dextrano (10%), por lâmina. As lâminas ficaram hibridando *overnight*, a 37°C. O sinal foi detectado utilizando antidigoxigenina-rodamina para a sonda de rDNA 5S e avidina-FITC para a sonda de rDNA 18S, com sinal amplificado com anti-avidina biotinilada (biotina conjugada). A hibridização foi realizada sob condições de alta estrigência (77%). Os cromossomos foram contra corados com uma mistura de 200 µL de *antifading* mais 1 µL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2 mg/mL), em seguida foram colocados 25 µL da mistura por lâmina. A lâmina foi coberta com lamínula e abrigada em local sem contato com luz.

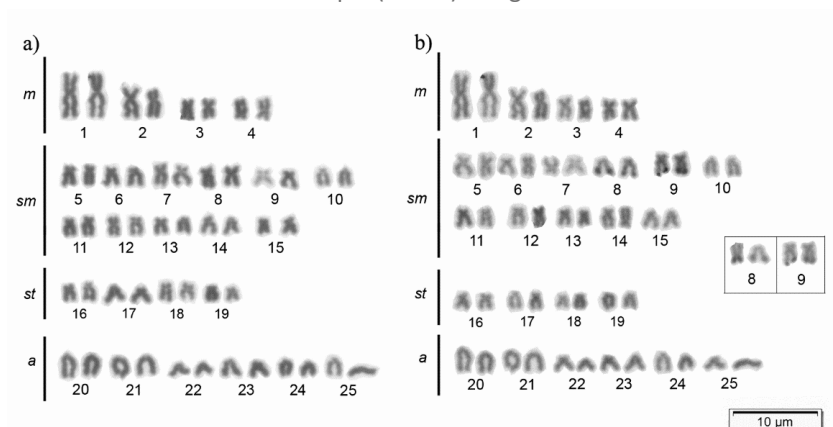
Estudos cariotípicos: As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão no microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX53 com câmera digital QColor5M acoplada. As

lâminas submetidas à FISH foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtros apropriados. As metáfases tiveram os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). 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 serão considerados com 2 braços cromossômicos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O número diploide analisado foi de 50 cromossomos (8m+24sm+6st+12a, FN=88) (Figura 2), igualmente distribuídos e machos e fêmeas, caracterizando ausência de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos. O Bandamento C demonstrou poucos blocos de heterocromatina com marcação conspícua em poucos pares de cromossomos, essa pequena quantidade de heterocromatina é recorrente em outros estudos desta espécie. O número diplóide de 50 cromossomos tem sido frequentemente observado em *Astyanax*. O grande número de espécies de *Astyanax* com esta característica pode ser considerado fator importante na realização de uma análise de parentesco, uma vez que o gênero não representa um grupo natural de espécies. Foi observado que o primeiro par de cromossomos metacêntricos se destaca em tamanho em comparação com outros cromossomos do complemento, característica comum em *Astyanax*.

Figura 2 – Cariótipos de *Astyanax laticeps* (a) corado com Giemsa e (b) C-banded. Em destaque (in box) as AgNORs.



Fonte: Autoria própria (2020).

O número diplóide de 50 cromossomos tem sido frequentemente observado em *Astyanax*, como em *A. argyrimarginatus* (GARUTTI, 1999), *A. elachylepis* (BERTACO, & LUCENA, 2006), *A. aff. bimaculatus*, e *A. xavante* (TENÓRIO, 2013), *A. scabripinnis* (VICARI, 2008), entre outras. De acordo com Mirande (2010) e Oliveira et al. (2011), o grande número de espécies de *Astyanax* com esta característica pode ser considerado fator importante na realização de uma análise de parentesco, uma vez que o gênero não representa um grupo natural de espécies.

Foi observado em *A. laticeps* o primeiro par de cromossomos metacêntricos que se destaca em tamanho em comparação com outros cromossomos do complemento e o predomínio de pares submetacêntricos. Este primeiro par de cromossomos é comum em *Astyanax* e também em outros gêneros de Characidae, o que pode ser uma característica plesiomórfica na família (MORELLI et al, 1983; TENÓRIO et al, 2013), e uma simplesiomorfia no gênero (FERREIRA-NETO, 2009, KAVALCO et al, 1928). O bandamento C evidenciou a presença de heterocromatina localizada predominantemente na região terminal do braço longo em três cromossomos (Figura 2-b), correspondendo com as NORs, como em Rosa et al., (2009). Nos exemplares analisados no presente trabalho, foram encontradas NORs em três cromossomos contendo Ag-NORs na região terminal, compreendendo apenas um cromossomo submetacêntrico e um único par homólogo de um cromossomo acrocêntrico, diferente do encontrado por Rosa et al., (2009), onde esses três cromossomos são todos subtelocêntricos.

Foram submetidas aos procedimentos de dupla hibridização *in situ* fluorescente (Double FISH) dois espécimes, um macho e uma fêmea, dos quais dez metáfases foram analisadas cada.

Figura 3 – Metáfase de *Astyanax laticeps* submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e rDNA 18S (sinal verde).



Fonte: A autoria própria (2020).

Estudos desenvolvidos por Rosa et al. (2009), através de análises por rDNA 45S de populações de *A. laticeps* oriundas do município de Forquethinha/RS, mostraram sinais fluorescentes fortes nas regiões telométricas, o que mostra semelhança com os resultados obtidos nesse trabalho no que tange a posição das marcações obtidas por análise do sítio de rDNA18S. Adicionalmente, Rosa et al. (2009) encontraram marcações em um único elemento homólogo em um grande par subtelocêntrico, o que também pode ser confirmado nos resultados desse estudo, no qual foi encontrada uma terceira marcação em um terceiro cromossomo, o que poderia indicar a ocorrência de uma possível deleção ou transposição entre homólogos (ROSA et al., 2009). Outra possibilidade seria um crossing desigual, resultando em um grande sítio em um dos homólogos e um sítio diminuto no outros, possivelmente indetectável pela limitação de sensibilidade da técnica de

FISH. Ainda, Montovani et al. (2005) analisando uma população de *A. scabripinis*, identificaram uma grande variabilidade cromossômica no que tange o local e número de sítios de rDNA 18S, paralelamente, os sítios de rDNA 5S se mostraram conservados em várias populações. Segundo Schleger (2016), resultados muito semelhantes foram detectados em populações de *A. laticeps* da bacia do rio Ribeira Iguape - Paraná, com variações de número de sítios e local para o rDNA 18S, enquanto o rDNA5S se conservou nas amostras. Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados neste estudo, no qual o número e local de sítios de rDNA 5S foi constante na análise das amostras e o rDNA 18S mostrou variância.

Almeida-Toledo et al. (2002) descreveram resultados cromossômicos de populações de *Astyanax* com resultados semelhantes, no qual a posição do rDNA 18S se encontra sempre em posição terminal do cromossomo, o que vai de encontro com os resultados encontrados nesse estudo. Galetti e Martins (2004) associaram essa posição terminal do rDNA 18S com a variabilidade em número de sítios nos cromossomos, uma vez que os sítios ficam mais vulneráveis à transposições. Enquanto os sítios de rDNA 5S são mais estáveis por estarem em posição intersticial. De acordo com Vicari et al. (2008) os cístrons de rDNA 5S tendem a ser conservados na região centromérica de um par de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos acrocêntricos, se mostrando uma característica conservada e possivelmente basal dentro do clado *Astyanax*.

Neste estudo, foram observados cístrons simples de rDNA 5S alocados na região intersticial de um par cromossômico metacêntrico. As marcações por sonda de rDNA 18S revelaram cístrons nas regiões terminais do braço curto de um único par subtelocêntrico. Esses resultados convergem com demais estudos realizados, os quais sugerem que uma característica comum em *Astyanax* é a ocorrência de sítios múltiplos para este marcador (FERREIRA-NETO et al., 2009; KAVALCO et al., 2011; PERES et al., 2012).

CONCLUSÕES

O número diplóide foi de $2n=50$ cromossomos para todos os espécimes de *Astyanax laticeps* analisados, além de ter sido verificado o primeiro par cromossômico grande em relação ao restante do complemento, características plesiomórficas para *Astyanax* e também para a família *Characidae*. As marcações do rDNA 5S se mostraram estáveis quanto a localização e número de sítios, enquanto as marcações de rDNA 18S apresentaram maior variação quanto ao número de sítios. Os dados aqui presentes ainda são prévios, porém ajudam a ampliar os conhecimentos referentes ao complexo *Astyanax laticeps*, auxiliando na futura determinação de espécies.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pelo fomento da bolsa, ao Câmpus Santa Helena pela estrutura, ao CNPq pelo financiamento, ao ICMBio pela autorização para coleta e a Polícia Ambiental de Santa Helena pelo apoio nas atividades de campo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. **Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax***. Cytogenetic Genome Research, v.97, p.229-233, 2002.
- ARTONI, R.F.; SHIBATTA, A.O.; GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; ALMEIDA, M.C.; VICARI, M.R. & BERTOLLO, L.A.C. ***Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei: Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil)**. Neotropical Ichthyology 4:197-202, 2006.
- AZPELIQUETA, M. M.; LOUREIRO, M. ***Astyanax laticeps* (Teleostei: Characiformes: Characidae) from rivers and streams of Uruguay**. Vertebrate Zoology. 2009.
- BERTACO, V. A. & C. A.S. LUCENA. **Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex**. Neotropical Ichthyology, 4(1): 53-60. 2006.
- BERTACO, V. A. & L. R. MALABARBA. **Description of new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the “*A. scabripinnis* species complex”**. Ichthyological Exploration of Freshwaters, 12(3): 221-234. 2001.
- BERTACO, V. A.; DE LUCENA, C. A. S. **Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil**. Neotropical Ichthyology, v. 8, n. 1, p. 7-20, 2010.
- ESCHMEYER, W.; FONG, D. **Species by family/ subfamily**. Catalog of Fishes. 2016.
- FERNANDES, C.A. & MARTINS-SANTOS, I.C. **Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)**. Hereditas 141: 328-332, 2004.
- FERREIRA-NETO, M., VICARI, M. R., CAMARGO, E. F., ARTONI, R. F., & MOREIRA-FILHO, O. **Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis)**. Genetics and Molecular Biology, doi: 10.1590/S1415- 47572009005000078. 2009.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using “in vitro” short treatment with colchicine**. Experientia. 49: 810-813. 1993.

GALETTI, P. M.; MARTINS, C. **Contribuição da hibridização in situ para conhecimento dos cromossomos de peixes.** In: GUERRA, M. (Org). FISH: Conceitos e Aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. P.61-88, 2004.

GARUTTI, V. **Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes, Characidae) procedente da bacia do Rio Araguaia, Brasil.** Revista Brasileira de Biologia 59(4): 585-591. 1999.

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

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. **Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae).** Genetica 122:239-244. 2004.

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

KAVALCO, K. F., BRANDAO, K. O., PAZZA, R., & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. ***Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*.** Genetics and Molecular Biology, doi: 10.1590/S1415 47572009005000055. 2009.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* - *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae).** Cytogenetic and Genome Research, 134(2): 108-19. 2011.

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

LIMA, F. C. T., MALABARBA, L. R., BUCKUP, P. A., SILVA, J. F. P., VARI, R. P., HAROLD, A., et al. **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. 106169). Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

MALABARBA, L. R. et al. **Guia de identificação de peixes da bacia do rio Tramandaí.** Ed. Via Sapiens, Porto Alegre, 2013.

MANTOVANI, M.; et al. **Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis***. Genetica. V. 123, p.211-216, 2005.

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

MIRANDE, J.M. & KOERBER, S. **On some species *Astyanax* reported erroneously from Argentina**. Ichthyological Contributions of Peces Criollos 35: 1-8. 2015.

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

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

MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L.A.C. ***Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a “species complex”**. Brazilian Journal of Genetics 14:331-357, 1991.

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, doi: 10.1080/00087114.1983.10797664. 1983.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016. 752 p.

OLIVEIRA M. L. M., FORESTI, F. **Mapeamento físico dos genes 18s e 5s em peixes do gênero *Trichomycterus* (Teleostei, Trichomycteridae)**. Universidade Estadual Paulista. 2011.

OLIVEIRA, C., AVELINO, G. S., Abe, K. T., MARIGUELA, T. C., BENINE, R. C., ORTÍ, G., et al. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling**. BMC Evolutionary Biology, doi: 10.1186/1471-2148-11-275. 2011.

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

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F. & BERTOLLO, L.A.C. **Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms.** Cytogenetic and Genome Research 112: 313-319. 2006.

PEREIRA, H. R. **Impacto das barragens sobre os peixes:** Das publicações mundiais às variações temporais regionais. Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Ambientais) -- Universidade de Brasília, 2020.

PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R. & COPPOLA, M.P. **Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari.** Ciência Rural, Santa Maria 39(6): 1851-1856. 2009.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A.C.; BUCKUP, P. A.; BLANCO, D. R.; KANTEK, D. L. Z.; MOREIRA-FILHO, O. **Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition:** karyotypic evidence in *Astyanax bimaculatus* group (Characiformes: Characidae). Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22: 519-526. DOI 10.1007/s11160-011-9246-2. 2012.

PINKEL, D.; STRAUME T.; GRAY, J.W. **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 2934-2938. 1986.

PRIOLI, S. M. A. P., PRIOLI, A. J., JÚLIO-JR, H. F., PAVANELLI, C. S., OLIVEIRA, A. V. & CARRER, H., et al. **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. 2002.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America,** Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

REIS, R.E., KULANDER S. O., FERRARIS C. J. **Chek list of freshwater fishes of South America.** Edipucrs, Porto Alegre. 2003.

RIBEIRO, A.C.; LIMA, F.C.T. & MENEZES, N.A. **Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul.** Pp. 261-276. In: Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B. (Eds.). Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. São Paulo: Roca, 729p. 2010.

ROSA, R., RUBERT, M., MALABARBA, L. R., MARTINS-SANTOS, I. C., GIULIANO-CAETANO, L. **Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system.** Neotropical Ichthyology, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 601-605, 2009.

SANTOS L. P., MORELLI S. **Análise Citogenética de peixes dos gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia* e *Bryconops* provenientes das regiões de Uberlândia/MG e Monte do Carmo/TO.** Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

SCHAEFER. S. A. **Conflict resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae).** In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. 1998.

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

TENÓRIO, R. C. C. O., VITORINO, C. A., SOUSA, I. L., OLIVEIRA, C., & VENERE, P. C. **Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group.** Neotropical Ichthyology, doi: 10.1590/S1679-6225201300030000. 2013.

VARI R. P., MALABARBA L. R. **Neotropical Ichthyology:** an overview. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. 1998.

VARI, R.P. & MALABARBA, L.R. **Neotropical ichthyology:** an overview. In: MALABARBA, L.R., REIS, R.E., VARI, R.P., LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS, 1-11. 1998.

VICARI, M.R.; NOLETO, R.B.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L.A.C. **Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex.** Evolutionary and biogeographical inferences. Genetics and Molecular Biology 31:173-179. 2008.