

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**SANDRO TONELLO**

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS DE EXEMPLARES DO GRUPO  
*Astyanax bimaculatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)  
ORIUNDOS DA REGIÃO DO LAGO DE ITAIPU - PR**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SANTA HELENA  
2018**

**SANDRO TONELLO**

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS DE EXEMPLARES DO GRUPO  
*Astyanax bimaculatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)  
ORIUNDOS DA REGIÃO DO LAGO DE ITAIPU – PR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco

**SANTA HELENA  
2018**

**Tonello, Sandro**

Análises citogenéticas de exemplares do grupo *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) oriundos da região do Lago de Itaipu - PR / Sandro Tonello.

Santa Helena, UTFPR, 2018

38 f. : il. ; 30 cm

**Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco**

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Santa Helena, 2018.

**Bibliografia: f. xxx – xxy**

1. *Astyanax bimaculatus* 2. Citotaxonomia. 3. Bacia do Alto Paraná. 4. Marcador Cromossômico. I. Blanco, Daniel Rodrigues, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. IV. Análises citogenéticas de exemplares do grupo *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) oriundos da região do Lago de Itaipu - PR.

**CDD: XX**

SANDRO TONELLO

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS DE EXEMPLARES DO GRUPO  
*Astyanax bimaculatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)  
ORIUNDOS DA REGIÃO DO LAGO DE ITAIPU - PR**

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 26 de novembro de 2018, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O aluno foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Bueno  
UTFPR

---

Prof. Dr. Heleno Brandão  
UTFPR

---

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco  
Orientador - UTFPR

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação de Curso.

Dedico este trabalho à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao seu programa de Iniciação Científica, como também aos órgãos de fomento CNPq e Fundação Araucária, esta monografia não seria possível sem sua ajuda.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por todo o apoio estrutural e financeiro, possibilitando minha formação profissional com excelência.

À minha família, pelo suporte ao longo dos primeiros quatro anos de minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu orientador e “pai científico” Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco, por todo incentivo, apoio, preocupação, amizade, puxões de orelha, e principalmente por ter me aturado durante os três anos em que fui seu orientado. Sem você eu teria me formado, mas não seria metade do que sou hoje.

À minha “mãe científica”, Profa. Dra. Vanessa Bueno, por ter iluminado meus primeiros passos dentro da universidade.

Agradeço a todos os meus professores, principalmente aos que não “pegaram leve”, pois como sempre é dito: “Mar calmo nunca fez bom marinheiro”.

Às técnicas de laboratório Karina, Josiane, Andreine e Jaqueline, pela amizade e por me impedir de “taca” fogo no laboratório! (Nunca tentei haha!)

Aos meus amigos de laboratório (e fora dele) Natália Lima Lira (amorção) e Luan Felipe Schimmelfennig (quase três anos e ainda tenho dificuldade em escrever seu sobrenome), por todo o companheirismo, amizade e aturação! Hahaa, obrigado!

À república LisosSomos (Rafa, Dani, Mika, Paulo, Silvio), por ter me ajudado a se estabelecer em Santa Helena, passando necessidades, e por ter mostrado que, algumas vezes, tudo o que você precisa é de um amigo.

“Até mais, e obrigado pelos peixes.”  
- O guia do mochileiro das galáxias, 1979.

## RESUMO

TONELLO, Sandro. **Análises citogenéticas de exemplares do grupo *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) oriundos da região do Lago de Itaipu – PR.** 2018. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2018.

As dificuldades na identificação e na determinação de relações filogenéticas ocorrem devido às espécies crípticas do gênero *Astyanax*, que acabam sendo agrupadas em táxons polifiléticos, como o grupo *Astyanax bimaculatus*, estudado no presente trabalho. O grupo *Astyanax bimaculatus* é representado por aproximadamente 22 espécies e subespécies que possuem como principal característica morfológica a presença de uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons e uma mancha negra no pedúnculo caudal. O objetivo do presente trabalho foi analisar, utilizando métodos citogenéticos clássicos, exemplares de *Astyanax bimaculatus* oriundos da região de influência do Lago de Itaipu e compará-los com espécies já descritas na literatura. Foram capturados, com tarrafas e peneiras, 71 indivíduos de *A. bimaculatus* em dois tributários do Lago de Itaipu (Bacia Hidrográfica do Alto Paraná III), e 23 exemplares coletados em Pisciculturas locais. Os indivíduos coletados foram acondicionados em aquários aerados no Laboratório de Ictiologia e Limnologia da UTFPR – Santa Helena. Após a obtenção da suspensão celular, foram analisadas cerca de 10 células metafásicas por indivíduo. Para a caracterização citogenética foram utilizadas a coloração convencional por Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata (Ag-NORs). As análises mostraram que, para estas populações, foi caracterizado o número diploide de 50 cromossomos sem a presença de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos. Foram encontradas as seguintes variações nas fórmulas cariotípicas: 12m + 22sm + 8st + 8a, NF=92 (Córrego São Gabriel), 10m + 24sm + 8st + 8a, NF=92 (Córrego Sanepar), 12m + 22sm + 8st + 8a, NF=92 (Piscicultura Cerâmica) e 10m + 18sm + 14st + 8a, NF=92 (Piscicultura SH). As populações apresentaram acúmulo de heterocromatina preferencialmente nas regiões terminais e centroméricas, e NORs simples nos braços curtos de cromossomos subteloentéricos. Este estudo auxilia na compreensão do complexo *A. bimaculatus*, possibilitando um melhor entendimento para uma futura identificação de espécies devido às diferenças genéticas encontradas, sua conservação e proteção.

**Palavras chave:** *Astyanax bimaculatus*. Citotaxonomia. Bacia do Alto Paraná. Marcador Cromossômico.



## ABSTRACT

TONELLO, Sandro. **Cytogenetic analysis of *Astyanax bimaculatus* group specimens (Characiformes, Characidae) from the region of Itaipu Lake – PR.** 2018. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2018.

The difficulties in identifying and determining phylogenetic relationships occur due to the cryptic species of the genus *Astyanax*, which end up being group in polyphyletic taxa, such as the *Astyanax bimaculatus* group, studied in the present work. The *Astyanax bimaculatus* group is represented by approximately 22 species and subspecies whose main morphological characteristic is the presence of a horizontally oval black humeral spot, two brown vertical bars and a black spot on the caudal peduncle. The objective of the present work was to analyze, using classical cytogenetic methods, *Astyanax bimaculatus* specimens from the region of influence of Itaipu Lake and compare them with species already described in the literature. Were captured seventy - one individuals of *A. bimaculatus*, using fishnets and sieves, in two tributaries of Itaipu Lake (Alto Paraná III Hydrographic Basin), and 23 specimens were collected in local fish farms. The collected individuals were conditioned in aerated aquaria in the Laboratory of Ichthyology and Limnology of UTFPR - Santa Helena. After obtaining the cell suspension, were analyzed about 10 metaphase cells per individual. For the cytogenetic characterization, were used conventional staining by Giemsa, C-banding and impregnation by silver nitrate (Ag-NORs). For these populations, analyzes showed that the diploid number of 50 chromosomes was characterized without the presence of a heteromorphic sex chromosome system. Were found the following variations in the karyotype formulas:  $12m + 22sm + 8st + 8a$ ,  $NF = 92$  (Córrego São Gabriel),  $10m + 24sm + 8st + 8a$ ,  $NF = 92$  (Ceramic Pisciculture) and  $10m + 18sm + 14st + 8a$ ,  $NF = 92$  (SH Fishery). The populations showed accumulation of heterochromatin preferentially in the terminal and centromeric regions, and simple NORs in the short arms of subtelocentric chromosomes. This study assists in the understanding of the *A. bimaculatus* complex, allowing a better understanding for future species identification due to the genetic differences found, its conservation and protection.

**Keywords:** *Astyanax bimaculatus*. Cytotaxonomy. High Paraná Basin. Chromosome Marker.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Exemplar de <i>Astyanax bimaculatus</i> . .....	19
<b>Figura 2</b> - Pontos de Coleta de <i>Astyanax bimaculatus</i> . Ponto 1: Piscicultura SH; Ponto 2: Piscicultura Cerâmica; Ponto 3: Córrego Sanepar; Ponto 4: Córrego São Gabriel.....	20
<b>Figura 3</b> – Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Astyanax bimaculatus</i> da população do Córrego São Gabriel), corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque ( <i>in box</i> ) Ag-NORs. ....	23
<b>Figura 4</b> – Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Astyanax bimaculatus</i> da população do Córrego Sanepar, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque ( <i>in box</i> ) Ag-NORs. ....	24
<b>Figura 5</b> – Cariótipo de exemplar macho de <i>Astyanax bimaculatus</i> da população da Piscicultura Cerâmica, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque ( <i>in box</i> ) Ag-NORs. ....	24
<b>Figura 6</b> – Cariótipo de exemplar macho de <i>Astyanax bimaculatus</i> da população da Piscicultura SH, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque ( <i>in box</i> ) Ag-NORs.....	25
<b>Figura 7</b> – Compilação dos cariótipos das populações analisadas no presente trabalho. ....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resumo dos resultados obtidos para as populações analisadas no presente trabalho. ....	28
--	----

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3.1	Características gerais de <i>Astyanax</i> .....	15
3.2	Aspectos taxonômicos, citogenéticos e genéticos de <i>Astyanax</i> .....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1	Obtenção de cromossomos mitóticos.....	20
4.2	Preparo de lâminas.....	21
4.3	Detecção da distribuição da heterocromatina .....	21
4.4	Detecção de regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) .....	21
4.5	Estudos cariotípicos .....	22
5	RESULTADOS .....	23
6	DISCUSSÃO.....	27
7	CONCLUSÕES .....	30
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
9	REFERÊNCIAS .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna neotropical compreende a maior diversidade entre os peixes, possuindo mais de 9.100 espécies continentais e costeiras descritas atualmente. O Brasil apresenta sistemas hidrográficos de grandes proporções, destacando-se no quesito diversidade de peixes em rios e riachos, contendo mais de 5.160 espécies de águas continentais, agrupadas em 20 Ordens, 79 Famílias e 739 Gêneros (REIS et al., 2016). Tal diversidade é oriunda de processos de irradiação, extinção, e das alterações na dinâmica de rios e bacias hidrográficas como, por exemplo, a construção de represas e transposições de rio; e também de processos históricos e ecológicos ao longo do tempo (RIBEIRO et al., 2010). Sendo assim, o conhecimento da ictiofauna regional é de suma importância, levando ao desenvolvimento de ações que possam contribuir com a preservação e manejo destes sistemas aquáticos (VARI & MALABARBA, 1998).

A Bacia do Alto Rio Paraná compreendia o trecho da nascente do rio até os antigos saltos de Sete Quedas, porém com a construção da barragem da Usina Hidrelétrica de Itaipu, este limite se estendeu 150Km abaixo, possibilitando a dispersão de parte da ictiofauna do Médio-Baixo Rio Paraná para o Alto Rio Paraná, com o acréscimo no número de espécies (GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Atualmente o trecho pertencente ao Alto rio Paraná possui aproximadamente 211 espécies pertencentes a 41 famílias e 10 ordens, sendo os Siluriformes e Characiformes as mais representativas (OTA et al., 2018).

A bacia do Médio-Baixo Rio Paraná compreende desde a Usina Hidrelétrica de Itaipu até a conexão com o Rio Paraguai. Este trecho também recebe águas do Rio Iguaçu, que tem sua ictiofauna dividida devido à ocorrência das Cataratas do Iguaçu. A Bacia do Alto Rio Paraná é subdividida nas Bacias do Paraná I, Paraná II e Paraná III. A Bacia do Paraná I, porção mais ao norte do Rio Paraná, abrange 6 municípios e possui uma área total de 1.267,10Km<sup>2</sup>, seus principais afluentes são o Córrego Areia Branca e o Rio Patrão. A bacia do Rio Paraná II abrange 8 municípios e possui uma área total de 2.256,40Km<sup>2</sup>, seus principais afluentes são Ribeirão do Veado e Rio Pacaraí. Por fim, a Bacia do Paraná III, que possui uma área total de 7.979,40Km<sup>2</sup>, abrange 28 municípios, dentre os quais se pode destacar Cascavel, Toledo, Foz do Iguaçu, Medianeira e Santa Helena. Os principais afluentes da Bacia

do Rio Paraná III são os Rios São Francisco, que nasce em Cascavel, Guaçu que nasce em Toledo, São Francisco Falso que nasce em Céu Azul e o Ocoí que nasce em Matelândia (SEMA, 2010).

Characidae possui a maior representação dentro de Characiformes, atingindo recentemente um total de mais de 1.100 espécies reconhecidas. Dentre os diversos gêneros pertencente à Characidae podemos destacar o grupo *Astyanax*, representado por peixes de pequeno porte, popularmente conhecidos como lambaris ou piabas, com aproximadamente 147 espécies válidas (ESCHMEYER, 2016).

Atualmente o grupo *Astyanax* é considerado um táxon polifilético, que compreende espécies com formas bastante semelhantes, e delimitações taxonômicas pouco detalhadas. As semelhanças morfológicas apresentadas pelas espécies dificultam a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas dentro do gênero (MELO, 2001; MIRANDE, 2010; OLIVEIRA, 2011). O gênero também apresenta espécies crípticas, o que reforça sua complexidade e dificuldade de identificar as espécies (ROSSINI, 2016), o que acaba gerando complexos de espécies, como o complexo *Astyanax scabripinnis* (BERTACO & LUCENA, 2006) e *Astyanax bimaculatus* (CUNHA et al., 2018). *Astyanax bimaculatus* compreende aproximadamente 22 espécies e subespécies, que possuem como característica principal a presença de uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons e uma mancha negra no pedúnculo caudal (LUCENA & SOARES, 2016). Das 22 espécies e subespécies presentes no complexo, apenas 8 destas foram estudadas utilizando dados citogenéticos clássicos e moleculares

O uso de marcadores citogenéticos permite verificar a existência tanto de homeologias, quanto divergências cromossômicas entre espécies morfológicamente muito parecidas (crípticas). Análises citogenéticas e morfológicas sugerem que *Astyanax scabripinnis*, por exemplo, corresponde a um complexo de espécies composto por pelo menos 15 unidades biológicas distintas (BERTACO & LUCENA, 2006) e que o grupo *A. bimaculatus* pode conter aproximadamente 22 espécies (LUCENA & SOARES, 2016). Deste modo, as diferenças citogenéticas encontradas em espécies do mesmo grupo podem auxiliar a elucidar problemas de ordem taxonômica e evolutiva.

Por fim, em decorrência da problemática taxonômica e sistemática no grupo *Astyanax bimaculatus*, o número ainda incerto de espécies e o polifiletismo do grupo, a utilização de técnicas de citogenética pode contribuir para a identificação, caracterização e diferenciação das populações, auxiliando no estabelecimento das relações filogenéticas dentro do gênero e na compreensão da evolução do grupo, além de contribuir para o conhecimento da diversidade de espécies em *Astyanax*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar, por meio de marcadores cromossômicos clássicos (Coloração por Giemsa, determinação do padrão de distribuição heterocromático (Banda-C) e impregnação por nitrato de prata (AgNORs), diferentes populações do grupo *Astyanax bimaculatus* oriundos da região do Lago de Itaipu, Estado do Paraná.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinação do número diploide ( $2n$ ), fórmula cariotípica e número fundamental (NF) dos exemplares analisados;
- Obtenção do padrão heterocromático e do número / localização das regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs).
- Comparar os dados citogenéticos das populações analisadas, verificando as possíveis diferenças e semelhanças cromossômicas.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

A ictiofauna neotropical compreende a maior diversidade entre os peixes, possuindo mais de 9.100 espécies continentais e costeiras descritas atualmente (REIS et al., 2016). O Brasil apresenta sistemas hidrográficos de grandes proporções, que abrigam uma ampla diversidade de peixes, os quais são representados por mais de 5.160 espécies de águas continentais, agrupadas em 20 Ordens, 79 Famílias e 739 Gêneros (REIS et al., 2016).

O alto Rio Paraná, trecho compreendido entre o Porto Primavera (Rosana, SP) e a Usina Hidrelétrica de Itaipu (Foz do Iguaçu, PR), possui 211 espécies agrupadas em 126 Gêneros (OTA et al., 2016). A alta diversidade de peixes encontrada, pode ser atribuída a processos contínuos de extinção e irradiação de grupos que antigamente eram diversificados, como também devido a alterações geológicas que influenciaram a dinâmica de Bacias Hidrográficas e Rios, provocando alterações em processos ecológicos (RIBEIRO et al., 2010). Toda a biodiversidade Neotropical é então um importante objeto de estudos para melhor compreensão e conhecimento da ictiofauna que compõem as águas continentais presentes no território brasileiro.

As citogenéticas clássica e molecular demonstram-se ferramentas de alta aplicabilidade em várias áreas da Biologia. Sua área envolve a Citotaxonomia, auxiliando na diferenciação genética de espécies crípticas; Biogeografia, comparando os dados obtidos com populações filogeneticamente próximas de outras localidades e bacias e Evolução, promovendo uma maior compreensão sobre a organização do genoma dos grupos, estudos de rearranjos cromossômicos, e também na determinação de árvores filogenéticas (PRIOLI et al., 2002; MATOSO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

#### 3.1 Características gerais de *Astyanax*

*Astyanax*, gênero que compreende peixes de pequeno porte conhecidos pelos nomes populares “piaba” ou “lambari” é considerado um dos mais diversos gêneros de Characidae. Possui distribuição do Sul dos Estados Unidos à região

Central da Argentina (LIMA et al., 2003; ESCHMEYER & FONG 2015). Estudos de levantamento ictiofaunísticos que apontam a presença de exemplares de *Astyanax* são descritos para a Bacia do Alto Rio Paraná, Bacia do Rio Iguaçu, Bacia do Paraná-Paraguai e Bacia do Rio Uruguai (GRAÇA & PAVANELLI, 2007; BAUMGARTNER et al., 2012; NERIS et al., 2010; ZANIBONI-FILHO et al., 2004). É pertinente ressaltar que o Gênero *Astyanax* está atualmente agrupado em *Incertae sedis* (LIMA et al., 2003).

O gênero é considerado, nos dias de hoje, um táxon polifilético que compreende espécies crípticas com poucas delimitações taxonômicas, fazendo com que a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas no gênero tornem-se tarefas extremamente difícil (MELO, 2001; MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Inseridos no gênero existem complexos (Grupos) de espécies, 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 et al., 2006).

### 3.2 Aspectos taxonômicos, citogenéticos e genéticos de *Astyanax*

A Citogenética tem se mostrado uma excelente ferramenta para elucidar problemas de ordem taxonômica, ecológica e evolutiva, como descrito por Bertaco & Lucena (2006), que demonstraram que *Astyanax scabripinnis* é um complexo de espécies com aproximadamente 15 espécies, utilizando dados cromossômicos e taxonômicos em seu embasamento. Em contrapartida, Pazza et al. (2008) analisando o complexo *Astyanax fasciatus*, sugeriram que o mesmo é composto por diversas espécies, sendo todas elas oriundas do Rio São Francisco, entretanto as outras espécies do leste do Brasil, América Central e Rio Paraná seriam espécies muito próximas denominadas *Astyanax aff. fasciatus*.

Aproximadamente 22 espécies e subespécies estão alocadas no complexo *A. bimaculatus*, tendo como principais características morfológicas a presença de

uma mancha umeral negra e horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons e uma mancha negra no pedúnculo caudal (LUCENA & SOARES, 2016). Mirande (2010), ao estudar diversos caracteres morfológicos, como a presença ou ausência de ganchos na nadadeira de machos adultos e presença de dentes superiores, propôs uma nova organização filogenética de Characidae, tendo como resultado a criação de dois novos ramos: os cladus “*Astyanax*” e “*Astyanax paris*”, buscando aproximar os gêneros listados em *Incertae sedis*.

Apesar dos inúmeros estudos de taxonomia, sistemática e genética relacionados à descrição de novas espécies de *Astyanax*, a classificação de alguns grupos permanece duvidosa. Muitas espécies provenientes da Bacia da Argentina e Bacia do Uruguai necessitam de revisões taxonômicas devido a descrições precoces ou fundamentadas provavelmente em número amostral pequeno. Podemos citar como exemplo *Astyanax aff. fasciatus*, sugerindo que deveria ser classificado como *Astyanax aramburui* ou *Astyanax rutilos* (MIRANDE & KOERBER, 2015).

Lucena & Soares (2016) ao analisarem taxonomicamente diversas populações do grupo *Astyanax bimaculatus*, provenientes das drenagens do rio do Prata e São Francisco e de sistemas costeiros do Sul do Brasil e Uruguai, propuseram, baseados em caracteres morfológicos, a não existência de espécies crípticas nos lotes estudados. Para os autores supracitados, *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis* e *A. asuncionensis* são sinônimos Júnior de *A. abramis*. Entretanto, tais autores não descartam a possibilidade de que a separação das diferentes linhagens esteja ocorrendo.

As espécies de *Astyanax* apresentam uma ampla complexidade cromossômica (TENORIO, 2013), com variações no 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).

*Astyanax* é um gênero complexo e de difícil entendimento, não obstante possuindo variações na fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF), e NORs, além de casos de triploidia, polimorfismos de heterocromatina e ocorrência de cromossomos B (MORELLI et al., 1983; KAVALCO et al., 2007; MACHADO et al.,

2012). Desta forma, em *Astyanax*, assim como em vários outros grupos de peixes, é possível verificar que os estudos sobre a variabilidade da posição de blocos heterocromáticos e de regiões organizadoras do nucléolo (NORs), auxiliam na compreensão de processos de evolução e diferenciação cariotípica (MARGARIDO & GALETTI-JR., 2000; MANTOVANI et al., 2004), como por exemplo, a amplificação de regiões ricas em C-G e diferentes rearranjos estruturais envolvendo regiões heterocromáticas.

Por fim, em decorrência da problemática taxonômica e sistemática no grupo *Astyanax bimaculatus*, a dificuldade na identificação das espécies, o número ainda incerto de espécies e o polifiletismo do grupo; a utilização da citogenética pode contribuir para a identificação, caracterização e diferenciação das populações/espécies em estudo, auxiliando no estabelecimento das relações filogenéticas dentro do gênero e na compreensão da evolução do grupo, além de contribuir para o conhecimento da diversidade de espécies em *Astyanax*.

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados (Licença permanente SISBIO 38532-2) 40 exemplares do grupo *Astyanax bimaculatus* (21 machos e 19 fêmeas) provenientes do Córrego São Gabriel (24°56'47.0"S 54°19'00.0"W), 31 exemplares (17 machos e 14 fêmeas) provenientes do Córrego Sanepar (24°51'54.3"S 54°19'48.8"W), tributários da região de influência do Lago de Itaipu, 6 exemplares (4 machos e 2 fêmeas) da Piscicultura Cerâmica (24°54'39"S 54°19'10"W) e 17 exemplares (13 machos e 4 fêmeas) da Piscicultura SH (24°52'43,1"S 54°19'53,7"W) (Fig. 1 e 2). Como critério para escolher as áreas de amostragem foram selecionados pontos próximos

Figura 1 - Exemplar de *Astyanax bimaculatus*.



Fonte: Próprio Autor, 2018.

Os exemplares foram levados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Santa Helena, mantidos em aquários aerados. Foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo na concentração de 100mg/L (GRIFFITHS, 2000; PEREIRA-DA-SILVA, 2009) para retirada de tecidos a fim de obter as 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 Conclusão de Curso 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 2 - Pontos de Coleta de *Astyanax bimaculatus*. Ponto 1: Piscicultura SH; Ponto 2: Piscicultura Cerâmica; Ponto 3: Córrego Sanepar; Ponto 4: Córrego São Gabriel.



Fonte: Google Maps.

#### 4.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de metáfases mitóticas foi utilizada uma porção do rim anterior de todos os espécimes coletados, uma vez que este órgão possui função hematopoiética. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos utilizou-se a técnica adaptada por Foresti et al. (1993), que consiste na extração do rim com o auxílio de pinças, homogeneização, e hipotonização do mesmo em cloreto de potássio (KCl 0,075 M), seguido de quatro etapas de fixação (Pré-fixação, Fixação 1, 2 e 3) com fixador gelado (metanol/ácido acético, 3:1). Cada etapa de fixação é procedida por uma centrifugação de 10 minutos à 1100rpm, descartando-se o sobrenadante após cada etapa e adicionando fixador gelado, de modo a preservar o material para futuras análises. Após finalizar todas as etapas de fixação, os materiais obtidos foram acondicionados em tubos de microcentrifuga e armazenados em temperatura de -10°C.

## 4.2 Preparo de lâminas

O preparo das lâminas ocorreu em duas etapas:

1 – Foi pingado 1-3 gotas de suspensão celular a uma altura de aproximadamente 80 cm sobre uma lâmina limpa, aquecida em água a aproximadamente 58 °C, após pingar o material, a lâmina foi secada ao ar.

2 – O material pingado na lâmina 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. Após deixar o corante agir por 7 minutos na lâmina, o mesmo foi descartado e a lâmina foi lavada em água corrente, sendo deixada para secar ao ar.

## 4.3 Detecção da distribuição da heterocromatina

A heterocromatina é uma região condensada do cromossomo, conhecida por conter genes que não são expressos, e utilizada pelos citogeneticistas para parear os cromossomos homólogos na montagem do cariótipo.

A técnica de Bandamento C é utilizada para detecção das regiões heterocromáticas e consiste na utilização de três soluções:

1. Hidróxido de Bário 5% ( $\text{BaOH}$ ) a fim de romper a ligação pentose-fosfato do nucleotídeo e
2. Ácido Clorídrico 0,2N ( $\text{HCl}$ ) (SUMNER, 1972) para depurinação, com modificações na etapa de coloração (LUI et al., 2012).

## 4.4 Detecção de regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs)

Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) são sítios de rDNA responsáveis pela síntese dos RNA ribossômicos. Para determinação das NORs foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980), a qual consiste na utilização de duas soluções:

1 – Gelatina 2%: Dissolver 2g de gelatina em 100mL de água deionizada, adicionando 1mL de Ácido Fórmico PA.

2 – Nitrato de Prata 50%: Dissolver Ag-NOR em água deionizada na proporção  $\frac{1}{2}$  (Ag-NOR 4g + 8mL água deionizada)

A preparação da lâmina foi realizada adicionando-se duas gotas da Solução Gelatina 2% sobre uma lâmina previamente preparada (com material a ser analisado), e sobre cada gota de Gelatina 2%, duas gotas da solução Nitrato de Prata 50%. A lâmina foi coberta com lamínula e levada à estufa 70°, até atingir a cor caramelo. Posteriormente, a solução foi escorrida da lâmina sob água corrente, e a lâmina secada ao ar.

#### 4.5 Estudos cariotípicos

As preparações cromossômicas mencionadas anteriormente (coloração por Giemsa, bandamento-C e Ag-NORs) 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 acoplada. Os cromossomos homólogos das metáfases foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico 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, subtlocêntrico (st);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a).

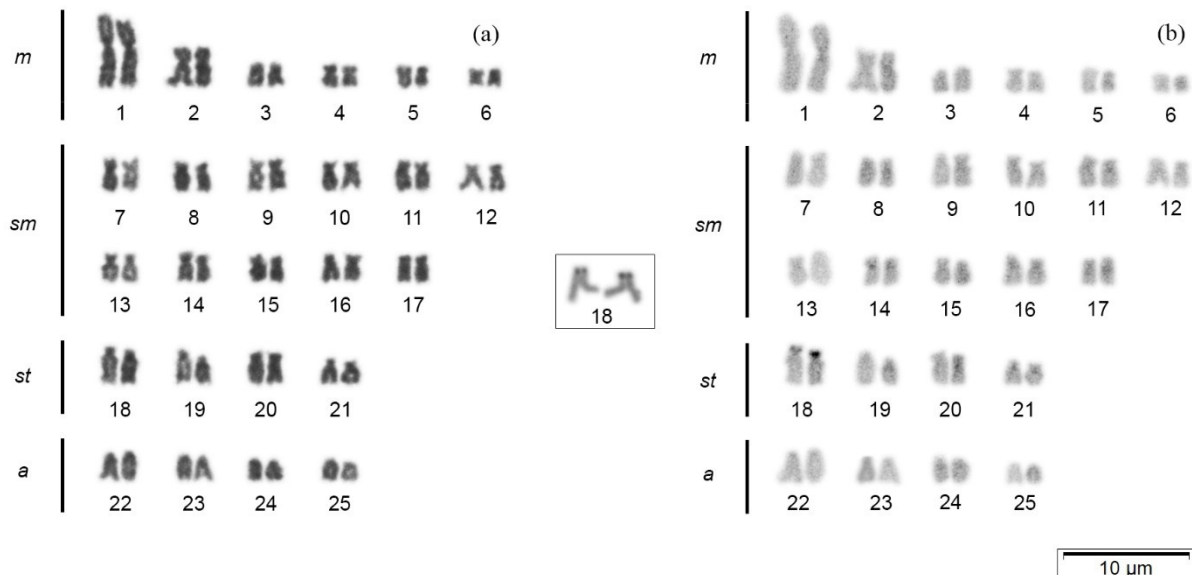
Na determinação do número fundamental (NF), consideraram-se os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos com 2 braços cromossômicos.



## 5 RESULTADOS

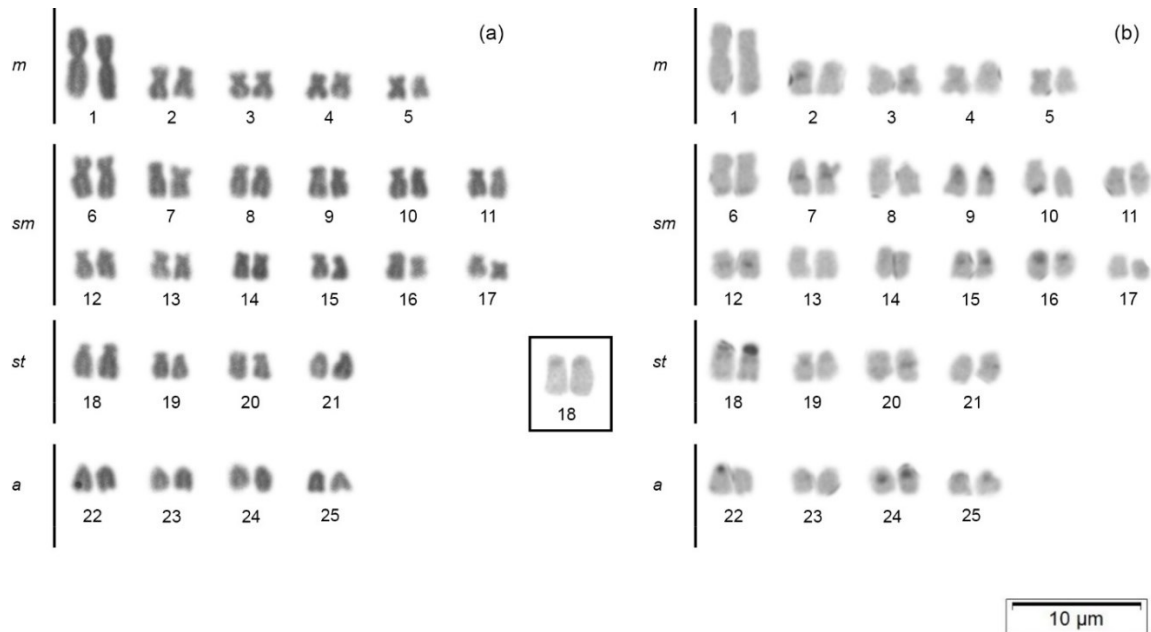
Para as análises, foram utilizadas cerca de 15 células metafásicas por indivíduo, totalizando aproximadamente 1200 células analisadas. O número diploide (2n) encontrado nos exemplares de *A. bimaculatus* analisados das quatro populações do presente trabalho foi de 50 cromossomos, porém divergências nas fórmulas cariotípicas das populações foram encontradas, sendo evidenciado  $12m + 22sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população oriunda do Córrego São Gabriel (Fig. 3),  $10m + 24sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população proveniente do Córrego Sanepar (Fig. 4),  $12m + 22sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população proveniente da Piscicultura Cerâmica (Fig. 5) e  $10m + 18sm + 14st + 8a$ , NF=92 para a população proveniente da Piscicultura SH (Fig. 6). É pertinente ressaltar que não foram observadas diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas, ou seja, não foi evidenciado nenhum sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (Fig. 3a, 4a, 5a e 6a).

Figura 3 – Cariótipo de exemplar fêmea de *Astyanax bimaculatus* da população do Córrego São Gabriel), corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque (*in box*) Ag-NORs.



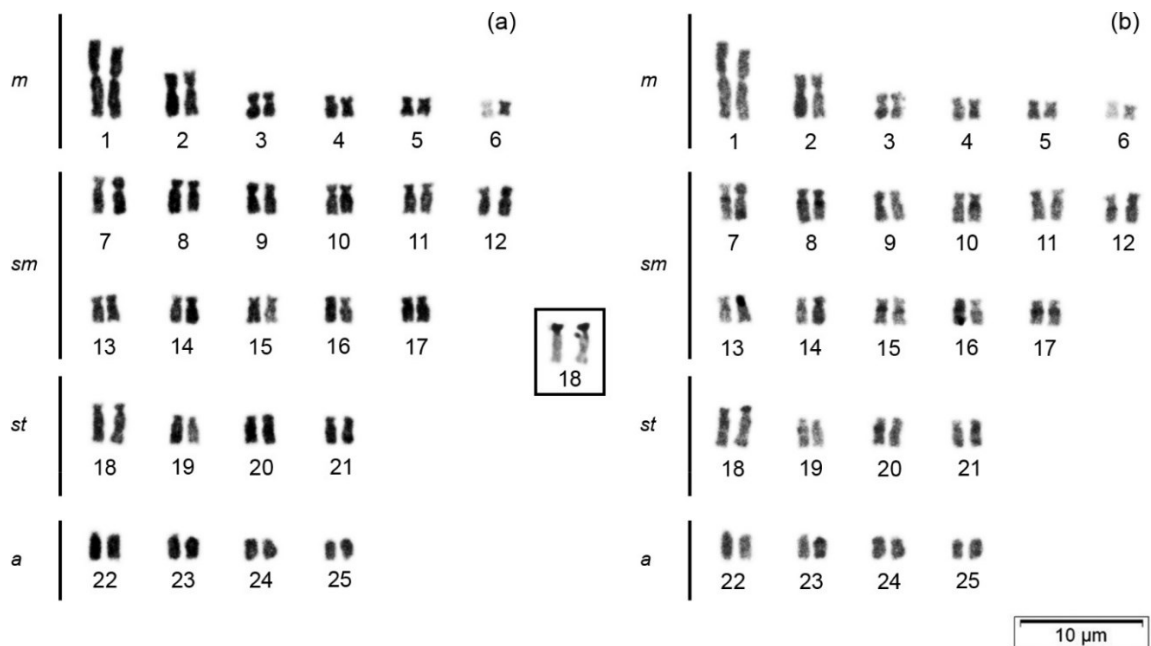
Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 4 – Cariótipo de exemplar fêmea de *Astyanax bimaculatus* da população do Córrego Sanepar, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque (*in box*) Ag-NORs.



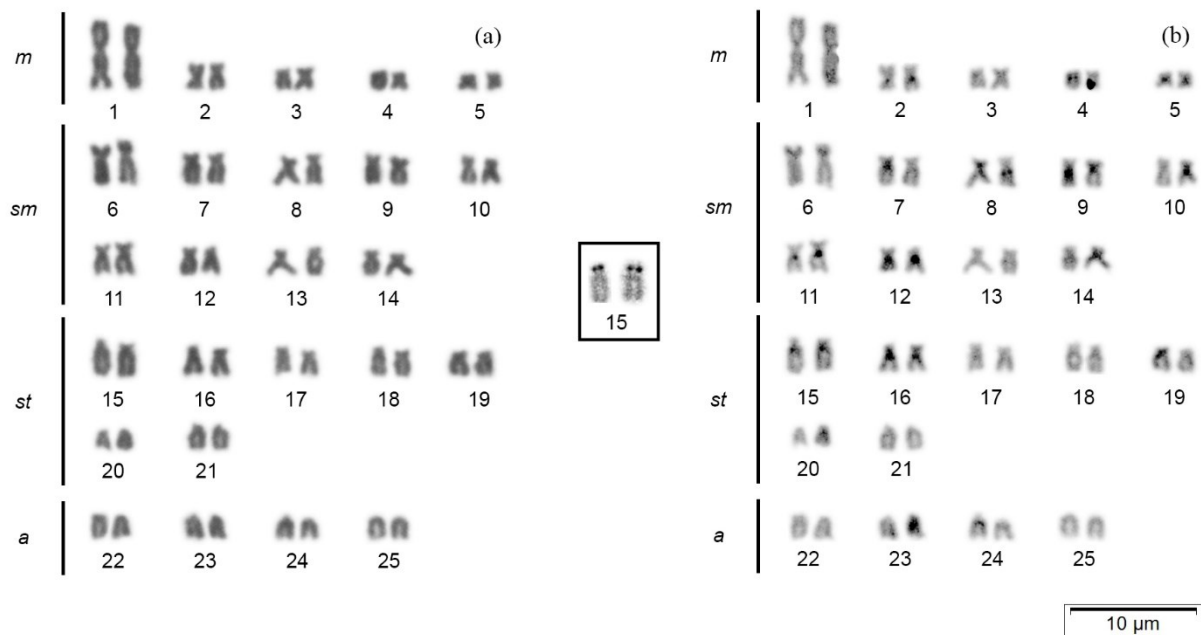
Fonte: Próprio autor, 2018.

Figura 5 – Cariótipo de exemplar macho de *Astyanax bimaculatus* da população da Piscicultura Cerâmica, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque (*in box*) Ag-NORs.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 6 – Cariótipo de exemplar macho de *Astyanax bimaculatus* da população da Piscicultura SH, corado com Giemsa (a) e C-bandados (b). Em destaque (*in box*) Ag-NORs.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, para a população proveniente do Córrego São Gabriel, foram evidenciadas bandas centroméricas pálidas nos pares cromossômicos 11, 14, 16, 17, 20, 21 e bandas terminais nos pares cromossômicos 18 e 22 (Fig. 3b). Para a população oriunda do Córrego Sanepar, foram evidenciadas bandas centroméricas nos pares cromossômicos 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 19, 20, 21 e terminais nos pares 9, 16, 18 e 22 (Fig. 4b). Para a população da Piscicultura Cerâmica, o bandamento C evidenciou bandas pericentroméricas / intersticiais nos pares 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 21 e terminais nos pares 11, 13, 18, 21 e 23 (Fig. 5b). Por fim, para a população da Piscicultura SH, foram evidenciadas bandas centroméricas nos pares cromossômicos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 19 e bandas terminais nos pares 1, 3, 6, 19, 23 e 24 (Fig. 6b).

Os exemplares do Córrego São Gabriel, do Córrego Sanepar e da Piscicultura SH apresentaram acúmulo de heterocromatina preferencialmente nas regiões centroméricas e terminais, enquanto os exemplares da Piscicultura Cerâmica evidenciaram heterocromatina pericentromérica / intersticial. As

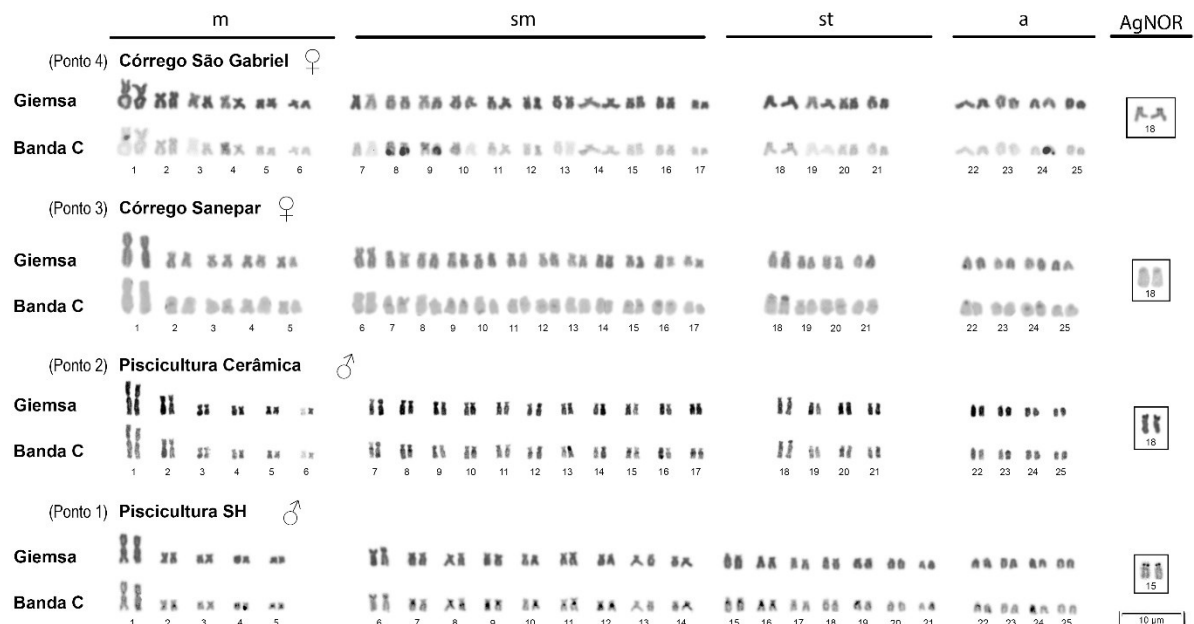
populações do Córrego São Gabriel e Sanepar apresentaram bandas mais pálidas comparadas às bandas dos indivíduos provenientes das Pisciculturas, que demonstraram bandas mais evidentes.

A impregnação por nitrato de prata revelou NORs simples no braço curto dos cromossomos subtelocêntricos do par 18 nas populações oriundas dos pontos São Gabriel, Sanepar e Cerâmica (Fig. 3, 4 e 5, *in box*), e no braço curto dos cromossomos subtelocêntricos do par 15 da população oriunda do ponto Piscicultura SH. As populações dos pontos São Gabriel, Sanepar e Cerâmica evidenciaram NORs intercaladas com regiões heterocromáticas terminais conspícuas, diferente do encontrado na população da Piscicultura SH (Fig. 6, *in box*).

## 6 DISCUSSÃO

Com relação à macroestrutura cariotípica foi evidenciado nos exemplares analisados o primeiro par de cromossômico metacêntrico, destacando-se devido a seu tamanho relativamente maior que todos os outros cromossomos pertencentes ao complemento A (Fig. 7). Outro fator que pode ser observado é o número significativamente elevado de cromossomos submetacêntricos, os quais nem sempre são predominantes, como encontrado em *Astyanax argyrimarginatus*, *A. aff. bimaculatus*, *A. xavante* e *A. altiparanae* (TENORIO et al., 2013). Este primeiro par de cromossômico é facilmente encontrado no gênero estudado e também em outros gêneros da Família Characidae, sendo definido por Tenorio et al., (2013) como uma possível plesiomorfia na Família. Outra característica encontrada foi o número diploide de 50 cromossomos nas populações analisadas (Fig. 7; Tab.1), algo comum em *Astyanax*, evidenciado em *A. xavante* (TENORIO et al., 2013), *A. argyrimarginatus* (GARUTTI, 1999) e *A. scabripinnis* (VICARI et al., 2008).

Figura 7 – Compilação dos cariótipos das populações analisadas no presente trabalho.



Fonte: Próprio Autor, 2018.

Tabela 1 – Resumo dos resultados obtidos para as populações analisadas no presente trabalho.

	<b>Córrego São Gabriel</b>	<b>Córrego Sanepar</b>	<b>Piscicultura Cerâmica</b>	<b>Piscicultura SH</b>
<b>Machos</b>	21	17	4	13
<b>Fêmeas</b>	19	14	2	4
<b>2n</b>	50	50	50	50
<b>NF</b>	92	92	92	92
<b>Fórmula Cariotípica</b>	12+22+8+8	10+24+8+8	12+22+8+8	10+18+14+8
<b>Heterocromatina</b>	Centromérica e Terminal	Centromérica e Terminal	Pericentromérica/Intersticial, Terminal	Centromérica e Terminal
<b>Ag-NORs</b>	Simplex: Par 18	Simplex: Par 18	Simplex: Par 18	Simplex: Par 15
<b>Total de Exemplares</b>	40	31	6	17

Fonte: Próprio autor, 2018.

Em estudos recentes, que analisaram citogeneticamente espécies do grupo *A. bimaculatus*, foram apresentadas fórmulas cariotípicas com um número elevado de cromossomos submetacêntricos e número reduzido de metacêntricos, como em *A. lacustris* (6m+28sm+4st+12a, NF=88), *A. jacuhiensis* (8m+28sm+6st+8a, NF=92), *A. abramis* (8m+28sm+6st+8a, NF=92), *A. asuncionensis* (8m+24sm+6st+12a, NF=88), (GAVAZZONI et al., 2018). Entretanto, para as populações analisadas no presente trabalho, foram evidenciadas fórmulas cariotípicas contendo um maior número de cromossomos metacêntricos e menor de cromossomos submetacêntricos, com exceção da população oriunda da Piscicultura SH, que apresentou um número elevado de cromossomos subteloacêntricos (10m + 18sm + 14st + 8a, NF=92), que ao comparar com as demais populações analisadas, nos dá indício de espécies diferentes, o que reforça a necessidade de análises taxonômicas mais detalhadas para espécies crípticas. As diferenças encontradas entre as fórmulas cariotípicas podem ser explicadas devido a prováveis hibridizações e/ou inversões pericêntricas, tornando-as distintas das demais já descritas, evidenciando que tais rearranjos fazem são recorrentes na evolução cromossômica do grupo.

Análises do padrão de distribuição da heterocromatina (Bandamento-C) de outras espécies/populações de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* evidenciaram, na sua maioria, bandas pálidas centroméricas, teloméricas, e muitas intersticiais proximais (GAVAZZONI et al., 2018), as quais foram evidenciadas nas populações analisadas no presente trabalho, porém com padrões diferentes. Esta diferença nos dá indícios de que o padrão de distribuição heterocromático pode ser um excelente marcador populacional.

A impregnação por nitrato de prata evidencia as Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-NORs) que se encontravam ativas em uma intérfase anterior. Sítios únicos desta região, NORs simples, são comumente descritas em outros estudos do grupo *bimaculatus*, como em *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis*, *A. abramis* e *A. asuncionensis*, mas em cromossomos acrocêntricos (GAVAZZONI et al., 2018), diferente do presente estudo que as encontrou em cromossomos submetacêntricos. Tal diferença pode ser atribuída à variação no grau de condensação dos cromossomos ou a inversões pericêntricas que, como demonstrado anteriormente, são recorrentes na evolução cariotípica do grupo. É pertinente ressaltar, que somente com a realização de Hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) com sonda de rDNA 18S pode-se confirmar a presença de sítios únicos nas populações do presente trabalho.

## 7 CONCLUSÕES

Todas as populações analisadas, apesar da conservação do número diploide, apresentaram dados divergentes dos apresentados em outros trabalhos, contendo variações na fórmula cariotípica, no padrão de distribuição heterocromático e na localização das Regiões Organizadora do Nucléolo, sendo que estes padrões se mostram diferentes também entre as populações analisadas no presente trabalho. O fato de termos evidenciado diferenças entre as populações naturais e de piscicultura reforça a importância de evitar a soltura de exemplares de pisciculturas em córregos ou lagos naturais, e deste modo preservar as espécies nativas.

Levando em consideração a dificuldade de identificação e estabelecimentos de relações filogenéticas dentro do gênero, o presente estudo auxilia no entendimento sobre o complexo *Astyanax bimaculatus*, e fornece dados que auxiliam na citotaxonomia devido às diferenças citogenéticas evidenciadas principalmente na fórmula cariotípica, e sistemática no clado *Astyanax*, sendo possível comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura. Adicionalmente, os dados do presente trabalho, aliado a estudos moleculares e taxonômicos, podem fornecer dados que subsidiem ações de manejo e conservação das espécies pertencentes ao grupo *Astyanax bimaculatus* na região de Santa Helena – PR. Estes dados podem auxiliar na identificação das espécies naturais e de pisciculturas presentes na região de influência do Lago de Itaipu, promovendo ações de sensibilização sobre os impactos da soltura de peixes não nativos em ambientes naturais.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente Trabalho de Conclusão de curso busca auxiliar estudos futuros de *A. bimaculatus* em citogenética molecular e taxonomia, e no desenvolvimento de uma filogenia detalhada sobre o grupo. Este estudo também auxilia em futuros estudos em ecologia da conservação, visto que as populações apresentadas nesta monografia demonstraram diferentes fórmulas cariotípicas, padrões de heterocromatina e distribuição da região organizadora do nucléolo que as encontradas em outros trabalhos, considerando uma possível interação entre as populações de piscicultura e naturais, levando a perda da biodiversidade.

## 9 REFERÊNCIAS

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.

BAUMGARTNER, G., PAVANELLI, C. S., BAUMGARTNER, D., BIFI, A. G., DEBONA, T., FRANA, V. A. **Peixes do Baixo Rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 203p. 2012.

BERTACO, V. A. & LUCENA, C. A. S. **Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex**. Neotropical Ichthyology 4:53-60. 2006.

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.

CUNHA, M. S., FREGONEZI, A. R., FAVA, L., HILSDORF, A. W. S., CAMPOS, L. A. O., DERGAM, J. A. **Phylogeography and Historical Biogeography of the *Astyanax bimaculatus* Species Complex (Teleostei: Characidae) in Coastal Southeastern South America**. ZEBRAFISH. DOI: 10.1089/zeb.2018.1668. 2018.

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. **Species by family/subfamily**. 2015. Disponível em: <http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 25/09/2015.

ESCHMEYER, W. & FONG, D. Species by family/ subfamily. **Catalog of Fishes**. 2016. Electronic version (accessed 8 February 2016).

FERNANDES, C. A. & MARTINS-SANTOS, I. C. **Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)**. Hereditas 141: 328-332. 2004.

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

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.

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.

GRAÇA, W. J. & PAVANELLI, C. S. **Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná e Áreas Adjacentes**. Maringá: Eduem. 241p. 2007.

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.

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., 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.

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. **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.

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. **Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique.** *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438. 2012.

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. **Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax sp.*, and its significance for conservation.** *Hydrobiologia*.527: 223-225. 2004.

MELO, F. A. G. **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, 2001.

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

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*, 36:3, 235-244. 1983.

NERIS, N., VILLALBA, F., KAMADA, D., VIRÉ, S. **Guide to the Fish of Paraguay**. **Asunción**: Itaipu Binacional, 299p. 2010.

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

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

OTA, R. R., DEPRÁ, G. de C., GRAÇA, W. J. & PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**: revised, annotated and updated. *Neotropical Ichthyology*, 16(2), 1–111. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170094>, 2018

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.

PAZZA, R., KAVALCO, S. A. F., PENTEADO, P. R., KAVALCO, K. F. ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) - a multidisciplinary approach**. *Journal of Fish Biology* 72: 2002-2010. 2008.

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.

PRIOLI, S. M. A. P., PRIOLI, A. J., JÚLIO-JR, H. F., PAVANELLI, C. S., OLIVEIRA, A. V., CARRER, H. **Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)**

**in the Iguaçú river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers.** Genetics and Molecular Biology, 25:4, 421-430. 2002.

REIS, R. E., ALBERT, J. S., DI DARIO, F., MINCARONE, M. M. M., PETRY, P. L., ROCHA, L. R. **Fish biodiversity and conservation in South America.** Journal of Fish Biology, 10.1111/jfb.13016. 2016.

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

ROSSINI, B. C. et al. **Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding.** PloS one, v. 11, n. 12, p. e0167203, 2016.

SEMA – Secretaria de Estado do meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica.** Curitiba, 140p. 2010.

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., 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.

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.

ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S.; SHIBATTA, O.A. & NUÑER, A.P.O. **Catálogo ilustrado de peixes do Alto Rio Uruguai.** Florianópolis: Tractebel Energia, 128p. 2004.