

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

**NATÁLIA LIMA LIRA**

**MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES RIBOSSOMAIS 5S E 18S EM  
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Astyanax bimaculatus*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SANTA HELENA  
2019**

**NATÁLIA LIMA LIRA**

**MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES RIBOSSOMAIS 5S E 18S EM  
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Astyanax bimaculatus*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

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  
2019**

## TERMO DE APROVAÇÃO

NATÁLIA LIMA LIRA

### **MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES RIBOSSOMAIS 5S E 18S EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Astyanax bimaculatus* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 26 de junho de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A aluna foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

#### **BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Heleno Brandão  
UTFPR

---

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

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Daniel Rodrigues Blanco  
Orientador - UTFPR

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

Dedico este trabalho à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, bem como ao órgão de fomento CNPq, pois não seria possível desenvolver essa pesquisa sem os auxílios dos mesmos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Santa Helena, por todo o suporte financeiro e estrutural, possibilitando a realização das pesquisas neste trabalho, e também a minha formação em todos os aspectos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo fomento, ao ICMBio pela autorização para as coletas e à Polícia Ambiental de Santa Helena pelo apoio nas atividades de campo.

À minha mãe Zeneide Pereira de Lima e ao meu irmão Victor Hugo, por todo o apoio ao longo desses anos (não é fácil ficar longe de vocês!), agradeço de todo o coração.

Agradeço imensamente ao meu orientador e pai científico Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco, por tudo! Todo os incentivos, paciência, apoio nos momentos bons e ruins, pelas broncas e principalmente por toda a amizade e companheirismo ao longo desses anos, sempre me inspirando a seguir em frente! Eu sem sombra de dúvidas não poderia ter sido orientada por alguém melhor!

A todos os meus amigos por todos os momentos maravilhosos que passamos!

E um agradecimento muito especial ao meu maior amigo e companheiro Sandro (o que seria de mim sem seu apoio <3), obrigada!!

A todos os excelentes professores que passaram pela minha vida me iluminando com seus conhecimentos.

Às técnicas de laboratório mais queridas, por sempre nos auxiliarem da forma como podiam no laboratório e pela amizade, Karina, Josiane, Andreine, Jaqueline e Letícia, muito obrigada!

Aos integrantes do GEIN (Grupo de Estudos em Ictiologia Neotropical), por todo o suporte em coletas, no laboratório, e por todo o aprendizado!

“Até mesmo a menor das criaturas pode mudar o rumo do mundo.”

– O Senhor dos Anéis - A Sociedade do Anel, 1954.

## RESUMO

LIRA, Natália Lima. **Mapeamento físico dos genes ribossomais 5S e 18S em diferentes populações de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae)**. 2019. 41 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, 2019.

O mapeamento físico, por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), dos genes ribossomais 5S e 18S vem sendo utilizado com grande frequência em estudos citogenéticos de peixes neotropicais por auxiliar na resolução de problemas de ordem taxonômica, biogeográfica e filogenética. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar um mapeamento físico por FISH dos genes ribossomais 5S e 18S em populações de *Astyanax bimaculatus* oriundas de tributários e de pisciculturas da região de influência do Lago de Itaipú, região de Santa Helena - PR. Os espécimes foram coletados com auxílio de redes e tarrafas, e transportados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Câmpus* Santa Helena, onde foram mantidos em aquários até serem eutanasiados para obtenção da suspensão celular. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica de tratamento “*in vitro*”, que consiste na obtenção de metáfases mitóticas a partir de fragmentos do rim cefálico, uma vez que este possui função hematopoiética. Os cístrons de rDNA 5S e de rDNA 18S nos cromossomos foram mapeados usando dupla hibridização *in situ* fluorescente (Double-FISH), sob estringência de 77%. Foram observadas marcações simples de rDNA 5S na população da Piscicultura Santa Helena, Córrego São Gabriel e Piscicultura Cerâmica na posição pericentromérica do par metacêntrico 3, na população do Córrego Sanepar foram evidenciadas marcações de rDNA 5S na posição pericentromérica do par metacêntrico 3 e na posição pericentromérica do par subtelocêntrico 18. As marcações por sonda de rDNA 18S revelaram marcações nas regiões terminais do braço curto do par subtelocêntrico 18 das populações Piscicultura Cerâmica, Córrego Sanepar e Córrego São Gabriel. Na população Piscicultura Santa Helena, os cístrons foram encontrados na região terminal do braço curto do par subtelocêntrico 15. Na População do Córrego Sanepar houve uma sobreposição dos cístrons na posição terminal do braço curto do par subtelocêntrico 18. Os resultados revelaram que o rDNA 5S, é um excelente marcador genético para *Astyanax* porém novas análises devem ser realizadas para confirmar se as variações encontradas referem-se à polimorfismos populacionais ou tratam-se de características de unidades biológicas distintas, visto que *A. bimaculatus* é considerado um complexo de espécies.

**Palavras chave:** Lago de Itaipu. Lambari. FISH. Cromossomos.

## ABSTRACT

LIRA, Natália Lima. **Physical mapping of 5S and 18S ribosomal genes in different populations of *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae)**. 2019. 41 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, 2019.

The physical mapping by fluorescent in situ hybridization (FISH) of 5S and 18S ribosomal genes has been used with great frequency in cytogenetic studies of Neotropical fishes, to assist in the resolution of taxonomic, biogeographic and phylogenetic problems. In this way, the present work aimed to carry out a physical mapping by FISH of 5S and 18S ribosomal genes in populations of *Astyanax bimaculatus* from tributaries and piscicultures of the region of influence of Itaipú Lake, region of Santa Helena - PR. The specimens were collected with the aid of nets and containers, and transported alive to the Laboratory of Ichthyology and Limnology of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Santa Helena Campus, where they were kept in aquariums until they were euthanized to obtain the cellular suspension. For the preparation and obtaining of mitotic chromosomes, the technique of "*in vitro*" treatment was used, which consists in obtaining mitotic metaphases from fragments of the cephalic kidney, since this one has hematopoietic function. The cistrons of 5S rDNA and 18S rDNA were mapped on chromosomes using double fluorescence *in situ* hybridization (Double-FISH), under 77% stringency. Simple 5S rDNA markings were observed in the population of Santa Helena, Córrego São Gabriel and Piscicultura Cerâmica, in the pericentromeric position of the metacentric pair 3. In the population of Córrego Sanepar 5S rDNA markings were evidenced in the pericentromeric position of metacentric pair 3 and subtelocentric pair 18. The 18S rDNA probe tags revealed markings in the terminal regions of the short arm of the subtelocentric pair 18 of the populations Piscicultura Cerâmica, Córrego Sanepar and Córrego São Gabriel. In the population Piscicultura Santa Helena, in the terminal region of the short arm of the subtelocentric pair 15. In the Córrego Sanepar population there was an overlap of the cistrons in the terminal position of the short arm of the subtelocentric pair 18. The results revealed that the 5S rDNA is an excellent genetic marker for *Astyanax* but new analyzes should be carried out to confirm if the variations found refer to the population polymorphisms or they are characteristics of distinct biological units, since *A. bimaculatus* is considered a complex of species.

**Keywords:** Itaipú Lake. Lambari. FISH. Chromosomes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplar coletado de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> .....	18
Figura 2 – Pontos de Coleta dos exemplares de <i>Astyanax bimaculatus</i> analisados no presente trabalho.....	19
Figura 3 - Cariótipo de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> , provenientes do ponto Piscicultura Santa Helena submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e rDNA 18S (sinal verde) .....	24
Figura 4 - Cariótipo de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> , provenientes do ponto Piscicultura Cerâmica submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e rDNA 18S (sinal verde) .....	25
Figura 5 - Cariótipo de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> , provenientes do ponto Córrego São Gabriel submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e 18S (sinal verde).....	26
Figura 6 - Cariótipo de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> , provenientes do ponto Córrego Sanepar submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e 18S (sinal verde).....	27
Figura 7 – Todos os cariótipos montados em uma única imagem, para fins comparativos. ...	28
Figura 8 - Idiogramas de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> , das populações: Piscicultura Santa Helena (1), Piscicultura Cerâmica (2), Córrego São Gabriel (3) e Córrego Sanepar (4) evidenciando as marcações por rDNA 5S (vermelho) e 18S (azul) .....	30

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1	Objetivo geral .....	13
2.2	Objetivos específicos .....	13
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
3.1	Os peixes como objeto de estudo .....	14
3.2	Genes ribossomais.....	15
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
4.1	Exemplares e pontos amostrados.....	18
4.2	Preparação de cromossomos mitóticos – tratamento “ <i>in vitro</i> ” .....	20
4.3	Preparo de lâminas .....	20
4.4	Dupla hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (Double FISH).....	21
4.5	Estudos cariotípicos.....	21
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os peixes atualmente são o grupo com maior número e diversidade de espécies dentre os vertebrados, de 60.000 espécies viventes de vertebrados, 32.000 são de espécies de peixes. Possuem grande variedade de habitats aquáticos ocupados, inúmeras morfologias, e uma diversificada biologia, dificultando o estabelecimento de uma classificação e a compreensão das relações filogenéticas (NELSON, 2016). Esta grande variedade provém de processos de irradiação adaptativa, modificações nas formações dos rios e bacias hidrográficas, e de processos ecológicos ao longo de vários anos (RIBEIRO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010).

Estudar e entender a fauna ictiológica dessas regiões traz informações cruciais para que possam ser desenvolvidos projetos de preservação e manejo da fauna e sistema aquático local (VARI; MALABARBA, 1998). Por apresentar grande variedade, como já citado, e, por se encontrarem em posição basal na filogenia, os peixes simbolizam um grupo de grande interesse para estudos sobre variabilidade genética e processos de evolução (NELSON, 2016).

O gênero *Astyanax* possui grande quantidade de representantes na hidrografia brasileira, abrangendo os peixes de pequeno porte popularmente conhecidos como piabas ou lambaris. É citado como sendo o grupo de maior riqueza de espécies dentro de Characidae, possuindo aproximadamente de 150 espécies consideradas válidas distribuídas ao longo do sul da América do Norte até a região Central da Argentina (LIMA et al., 2003; ESCHMEYER; FONG 2016).

Atualmente compreende um táxon polifilético, possuindo espécies muito similares e limites taxonômicos com poucos detalhes, dificultando o reconhecimento e a organização de relações filogenéticas dentro deste gênero (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). Apresenta grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares (morfologicamente crípticas), o que torna *Astyanax* um grupo complexo ao nível taxonômico, dificultando a compreensão acerca da diversidade.

O grupo *A. bimaculatus* compreende aproximadamente 22 espécies e subespécies que possuem como característica uma mancha umeral preta uma mancha umeral (acima da nadadeira peitoral) preta, conspícua, e horizontalmente

ovalada, com duas barras verticais castanhas e uma mancha preta, se estendendo desde o pedúnculo caudal até a ponta do raio mediano da nadadeira caudal (GARUTTI; LANGEANI, 2009; LUCENA; SOARES, 2016). Em termos de descrição de novas espécies, o grupo é tido como o de maior atividade (ESCHMEYER; FONG, 2016).

A citogenética e a genética molecular têm sido ferramentas muito úteis para compreender as relações de ordem evolutivas de espécies e populações de peixes. Ajudando ainda a diferenciar e caracterizar espécies muito semelhantes, quando em cooperação com dados morfológicos, biogeográficos, comportamentais e biológicos (PRIOLI et al., 2002; MATOSO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

O mapeamento físico, por hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), dos DNAs ribossomais (em especial o rDNA 5S e o rDNA 18S) é muito utilizado em estudos citogenéticos em peixes neotropicais; (SOUZA et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006) por ser muito resolutivo quando se trata de problemas de ordem taxonômica, de biogeografia e da filogenética.

Desta forma, o presente projeto tem como objetivo realizar por meio de técnicas de citogenética molecular (Double-FISH:18S e 5S), um mapeamento físico destas sequências repetitivas em diferentes populações de *Astyanax bimaculatus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar o mapeamento físico, por meio de dupla Hibridização *in situ* fluorescente (Double-FISH) dos genes ribossomais 5S e 18S em diferentes populações de *Astyanax bimaculatus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter preparações cromossômicas dos espécimes de diferentes populações de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*;
- Determinar fórmula cariotípica das populações, número diplóide e número fundamental;
- Adquirir e marcar as sondas de rDNA 5S e 18S;
- Localizar os sítios dos genes ribossomais por meio de Hibridização *in situ* fluorescente;
- Verificar se os cístrons de rDNA 5S e o rDNA 18S são bons marcadores populacionais em *A. bimaculatus*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Os peixes como objeto de estudo

A ordem Characiformes é o grupo mais numeroso dentre a superordem Ostariophysi, com 2.212 espécies consideradas válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2019). As espécies pertencentes a este grupo ocorrem na região Neotropical, sendo encontradas em praticamente todos os ambientes de água doce (LUCENA, 1993). Encontra-se subdivida em 24 famílias, entre as quais Characidae está inserida (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2019). A família Characidae possui o maior número de representantes dentro de Characiformes, atingindo mais de 1.100 espécies consideradas válidas. Dentre os gêneros que fazem parte de Characidae, destaca-se *Astyanax*, representado por peixes de pequeno porte, popularmente conhecidos como lambaris (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2019).

O gênero *Astyanax*, é considerado o de maior riqueza em espécies de Characidae, possuindo aproximadamente 150 espécies descritas como válidas, distribuídas desde a região sul da América do Norte, até a Argentina em sua região central (LIMA et al, 2003; ESCHMEYER; FONG, 2016), com grande número de representantes nos sistemas hidrográficos brasileiros. Atualmente, *Astyanax* é considerado um táxon definido por uma semelhança que não foi herdada de um antepassado comum, compreendendo espécies muito similares e delimitações taxonômicas com poucos detalhes, dificultando o reconhecimento e a organização de relações filogenéticas dentro deste gênero (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). Apresenta grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares (morfológicamente crípticas), o que torna *Astyanax* um grupo complexo ao nível taxonômico, dificultando a compreensão acerca da diversidade.

O gênero ainda apresenta alguns complexos de espécies, como *Astyanax paranae* Eigenmann 1914, *Astyanax. scabripinnis* Jenyns 1842, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* Garutti; Britski 2000, desses complexos, pode-se destacar *A. bimaculatus* Linnaeus 1758, compreendendo aproximadamente 22 espécies válidas, que possuem como característica principal em seu corpo, uma mancha umeral (acima da nadadeira peitoral) preta, conspícua, e horizontalmente ovalada, com duas barras verticais castanhas e uma mancha preta, se estendendo desde o pedúnculo caudal até a ponta

do raio mediano da nadadeira caudal (GARUTTI; LANGEANI, 2009; LUCENA; SOARES, 2016). Em termos de descrição de novas espécies, o grupo é um dos mais ativos (ESCHMEYER; FONG, 2016), e embora ainda restem muitas dúvidas, devido às colaborações entre a sistemática, a taxonomia e a genética, as adversidades de ordem taxonômica estão sendo solucionadas (OLIVEIRA et al, 2011; MIRANDE; KOERBER, 2015).

A genética molecular e a citogenética têm se mostrado ferramentas muito úteis, contribuindo para uma significativa melhora no entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações da ictiofauna, além de estarem auxiliando na diferenciação e uma melhor classificação de espécies semelhantes, o resultado é ainda mais visível quando associa-se essas ferramentas a dados de morfologia, comportamento, biogeografia e a biologia dessas espécies de peixes (PRIOLI et al., 2002; MATOSO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Em *Astyanax*, os dados citogenéticos disponíveis manifestam uma grande variedade de cariótipos entre suas espécies. Os números diplóides (2n) demonstram uma variação de 36 cromossomos em *Astyanax schubarti* Britski 1964 (MORELLI et al., 1983) e *Astyanax correntinus* Holmberg 1891 (PAIZ et al., 2015) a 50 cromossomos como em *A. altiparanae* (PACHECO et al., 2011) e *A. jacuhiensis*. (SILVA et al., 2012)

### 3.2 Genes ribossomais

Os DNAs ribossomais (rDNA) são sequências repetitivas dispostas em *tandem* que codificam RNA ribossômico. O genoma dos organismos eucariotos apresenta porções heterocromáticas, a qual aloca a maioria das famílias de DNAs repetitivos. Estes podem ser definidos como segmentos de tamanhos variados repetidos milhares de vezes no genoma, sendo classificados em codificador, com funções biológicas bem definidas, e não codificador, cujo conjunto de sequências se encontra dispersa no genoma ou se repetem em *tandem* (GRIFFITHS et al., 2006). Os genes ribossômicos são organizados em duas famílias multigênicas, o rDNA 45S responsável por codificar os rRNAs 18S, 5.8S e 26S/28S e a família do rDNA 5S, que codifica o rRNA 5S (MARTINS; GALETTI, 2001). A família do rDNA 45S está frequentemente relacionada a regiões organizadoras de nucléolo, as quais são indiretamente evidenciadas por

impregnação com íon prata quando ativas (HOWELL; BLACK, 1980). Esses genes se repetem em sequências, e são facilmente identificados por FISH (REBORDINOS et al., 2013). Vários estudos têm procurado entender um pouco da dinâmica evolutiva dessas sequências repetitivas no genoma dos peixes (VICARI et al., 2010; GROSS et al., 2010; VALENTE et al., 2011).

O gene rRNA 5S foi descrito em muitos grupos de peixes, e está localizado principalmente na região intersticial do cromossomo (MARTINS; GALETTI, 2001), o que pode não ser apenas uma coincidência, mas sim que essa distribuição ribossômica secundária traz alguma vantagem para o genoma transportador (MARTINS; WASKO, 2004). Sabe-se que o rRNA 5S é composto por uma região conservada de 120 pares de bases, separados uns dos outros por porções não transcritas, que podem variar em tamanho ou sequência (NTSs). Essas variações se tornaram marcadores importantes para espécies específicas ou populações específicas. Existe uma variação no número de cromossomos marcados com o rRNA 5S no gênero *Astyanax*, com espécies com 1 par (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002), espécies com 2 pares (KAVALCO et al., 2009; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002), até populações com 4 pares, como em *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001), e a distribuição desses agrupamentos repetitivos parece ter sido conservada no grupo (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI, 2001; HASHIMOTO et al., 2011).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH –“Fluorescence *in situ* hybridization”) se tornou uma ferramenta capaz de mapear fisicamente sequências de nucleotídeos específicas nos cromossomos das espécies ou grupos em estudo (GUERRA, 2004). Foi usado pela primeira vez por Gall e Pardue (1969) em cromossomos, mas com os ajustes propostos por Pinkel et al. (1986) os protocolos sofreram pequenas mudanças, sendo usados até hoje para estudos em peixes. Uma das variações da FISH é a técnica de dupla hibridização *in situ* (Double-FISH) que é muito utilizada para examinar a relação entre a expressão de dois genes, sendo muito útil em localizações sintênicas de genes ribossômicos, como em estudos feitos por Almeida-Toledo et al. (2002).

Atualmente é a técnica preferencialmente utilizada para mapear fisicamente sequências de DNA nos cromossomos em preparações citológicas, a FISH é uma variação da técnica de Hibridização *in situ* (ISH) e se baseia no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, que podem ser facilmente separadas em fitas simples e posteriormente renaturadas voltando, assim, ao padrão de fita dupla.

Durante a renaturação dos cromossomos em preparações citológicas, o DNA cromossômico entra em contato com a sonda marcada (direta ou indiretamente com fluorocromos) que poderá ser hibridizado quando houver complementariedade entre a fita e a sonda. Quando observado sob luz ultravioleta com filtro seletivo o fluorocromo da fita hibridizada emitirá radiação luminosa sendo possível se determinar a sua localização (GUERRA, 2004).

Com relação às marcações por rDNA 18S em *Astyanax*, estudos realizados sugerem que uma característica comum é a ocorrência de sítios múltiplos, (KAVALCO et al., 2011; PERES et al., 2012). No entanto, existem estudos que mostram sítios simples de rDNA 18S em *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis*, *A. abramis*, e *A. asuncionensis* (GAVAZZONI et al. 2018). Estudos referentes à localização do gene ribossomal 5S têm demonstrado cístrons simples em populações de *A. elachylepis* Bertaco; Lucinda, 2005, *A. lacustris* Lütken 1875 (PERES et al., 2008), *A. altiparanae* (FERREIRA-NETO et al., 2009), *A. xavante* (TENÓRIO et al., 2013), *A. asuncionensis* Géry 1972 (PAIZ et al., 2015); e incidência de sítios múltiplos em populações de *A. abramis* Jenyns 1842, *A. scabripinnis* (VICARI et al., 2008), *A. fasciatus* (FERREIRA-NETO et al., 2012) e *A. correntinus* (PAIZ et al., 2015).

No gênero *Astyanax*, os cístrons de rDNA 5S possuem a tendência de serem conservados em regiões centroméricas/pericentroméricas de um par de cromossomos acrocêntricos e um par metacêntrico (VICARI et al., 2008); Porém, existem provas, onde encontram-se mais pares de cromossomos que carregam estes genes (FERRO et al., 2001; CASTRO et al., 2015), de modo que estes marcadores se mostram de grande valia para diagnose das espécies e tornando-se importantes marcadores para diagnose das espécies e possibilidades de relações de parentesco (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002).

O mapeamento físico, por hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), dos DNAs ribossomais (em especial o rDNA 5S e o rDNA 18S) é muito utilizado em estudos citogenéticos em peixes neotropicais; (SOUZA et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006) por ser muito resolutivo quando se trata de problemas de ordem taxonômica, de biogeografia e da filogenética.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Exemplos e pontos amostrados

Os espécimes de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* (Figura 1) foram coletados em sacos plásticos, aerados e com água em duas pisciculturas da região de Santa Helena – PR, e com auxílio de redes e/ou tarrafas e peneiras em dois tributários do Lago de Itaipu (Tabela 1) (Figura 2) - Licença permanente SISBIO 38532-3 (As pisciculturas e tributários foram selecionados com relação a sua proximidade ao município e ao Lago de Itaipu). Sendo logo em seguida levados vivos para o Laboratório de Ictiologia e Limnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Santa Helena, e mantidos em aquários aerados. Posteriormente, os espécimes foram sacrificados por overdose de óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000; PEREIRA-DA-SILVA, 2009), com o objetivo de obter os tecidos para as preparações citogenéticas e análises moleculares. O presente trabalho faz parte de um projeto universal, 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.

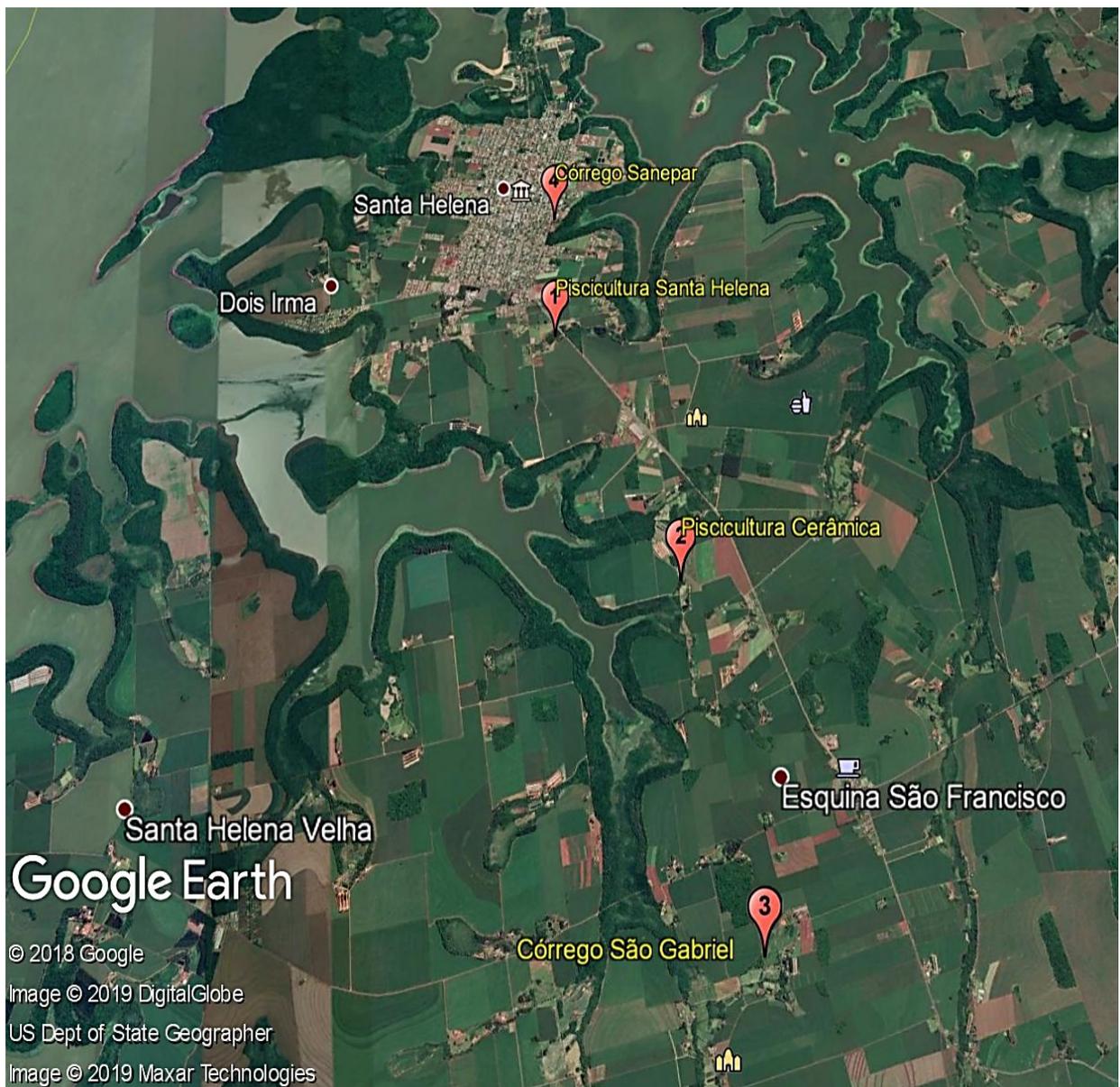


Figura 1 – Exemplo coletado de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*  
FONTE: Autoria própria.

Tabela 1 - Locais onde foram coletados os espécimes de *A. bimaculatus*.

População	Coordenadas geográficas	Elevação	Espécimes analisados	Machos	Fêmeas
Pisc. Santa Helena	24°52'41.55"S 54°19'53.53"O	248m	17	13	4
Pisc. Cerâmica	24°54'36.82"S 54°19'12.07"O	235m	6	4	2
Córrego São Gabriel	24°56'47.00"S 54°19'00.00"O	242m	40	21	19
Córrego Sanepar	24°51'53.65"S 54°19'47.56"O	275m	31	17	14

FONTE: Autoria própria.

Figura 2 – Pontos de Coleta dos exemplares de *Astyanax bimaculatus* analisados no presente trabalho.

FONTE: Google Earth.

#### 4.2 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 (anterior), uma vez que este possui função hematopoiética. Este, foi colocado em 10 mL de solução salina de Hanks, na qual o material foi bem dissociado. Posteriormente, a suspensão celular que foi obtida, foi ser 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 %, sendo estas bem misturadas com o material. O mesmo, foi então transferido para estufa a 36 °C, por 30 minutos e a seguir, centrifugado durante 10 minutos, a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida, foi adicionado 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi então levado novamente para estufa a 36 °C, por mais 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado cerca de 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético – 3:1) misturando-as com o material repetidas vezes. O material passou por nova centrifugação por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e, em seguida, adicionado 10 mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes, sendo em seguida novamente levado à centrífuga por mais 10 minutos a 1100 rpm. Essa etapa foi então repetida por mais duas vezes. Os materiais fixados foram devidamente acondicionados em tubos de “Eppendorf” e armazenados em freezer, para as análises posteriores.

#### 4.3 Preparo de lâminas

As gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina limpa, levemente aquecida, deixando que esta secasse 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, e, para o mapeamento, foi tratada segundo a técnica de hibridização *in situ*.

#### 4.4 Dupla hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (Double FISH)

Os cístrons de rDNA 5S e 18S nos cromossomos foram mapeados usando dupla hibridização *in situ* fluorescente (Double-FISH) de acordo com Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações. Para detecção dos sítios 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 consistiu 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. A hibridização foi realizada overnight, a 37°C. O sinal de detecção utilizado para 5S rDNA foi antidigoxigenina-rodamina, e para 18S rDNA utilizou-se avidina-FITC com sinal amplificado com anti-avidina biotilada (biotina conjugada). A hibridização foi realizada sob condições de alta severidade (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 guardada em local protegido da luz.

#### 4.5 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 de FISH foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro apropriado. As metáfases tiveram seus homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subteloentrico 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 foram considerados com 2 braços cromossômicos.

## 5 RESULTADOS

Para o levantamento do número diploide e montagem de fórmulas cariotípicas, foram analisadas aproximadamente 10 células metafásicas de cada um dos 94 indivíduos coletados. Foram analisadas aproximadamente 20 células metafásicas submetidas à FISH por indivíduo.

O número diploide ( $2n$ ) encontrado em todos os exemplares de *A. bimaculatus* das quatro populações coletadas foi de 50 cromossomos. No entanto, foram encontradas algumas diferenças entre as fórmulas cariotípicas das populações analisadas, sem alterações em seu número fundamental (NF). Foi evidenciado  $10m + 18sm + 14st + 8a$ , NF=92 para a população Piscicultura Santa Helena (Fig. 3),  $12m + 22sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população Piscicultura Cerâmica (Fig. 4),  $12m + 22sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população Córrego São Gabriel (Fig. 5), e,  $10m + 24sm + 8st + 8a$ , NF=92 para a população Córrego Sanepar (Fig. 6). Nas análises realizadas neste trabalho não foram observadas diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas, sendo assim, não foi evidenciado qualquer sistema de cromossomos sexuais heteromórficos.

Foram observados cístrons simples de rDNA 5S em 3 populações (Figura 3, 4 e 5). Sendo na população da Piscicultura Santa Helena, Córrego São Gabriel e Piscicultura Cerâmica na posição pericentromérica no par metacêntrico 3. Na população do Córrego Sanepar foram observadas duas marcações de rDNA 5S, sendo uma delas na posição pericentromérica do par metacêntrico 3 e outra na posição centromérica do par de cromossomos subtelocêntricos 18 (Fig. 6).

As marcações por sonda de rDNA 18S revelaram cístrons nas regiões terminais do braço curto do par subtelocêntrico 18 das populações da Piscicultura Cerâmica, Córrego Sanepar e Córrego São Gabriel (Figuras 4, 5 e 6), e na região terminal do braço curto do par subtelocêntrico 15 (Figura 3), população da Piscicultura Santa Helena. Na população do Córrego Sanepar houve uma sobreposição dos cístrons na posição terminal do braço curto do par subtelocêntrico 18 (Figura 6). Todos os cariótipos montados foram juntados na figura 7 para fins comparativos.

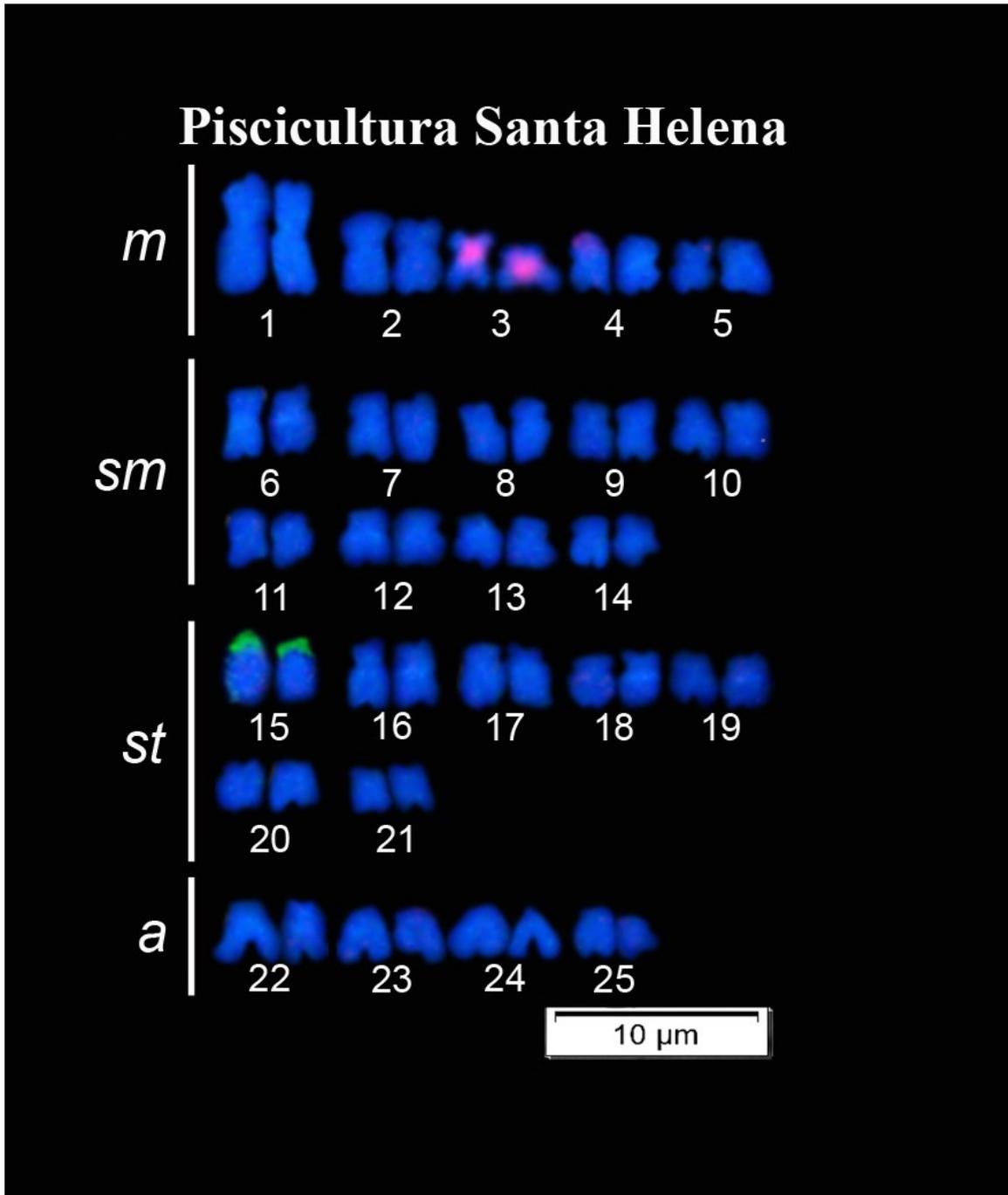


Figura 3 - Cariótipo de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*, provenientes do ponto Piscicultura Santa Helena submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e rDNA 18S (sinal verde)

FONTE: Autoria própria.

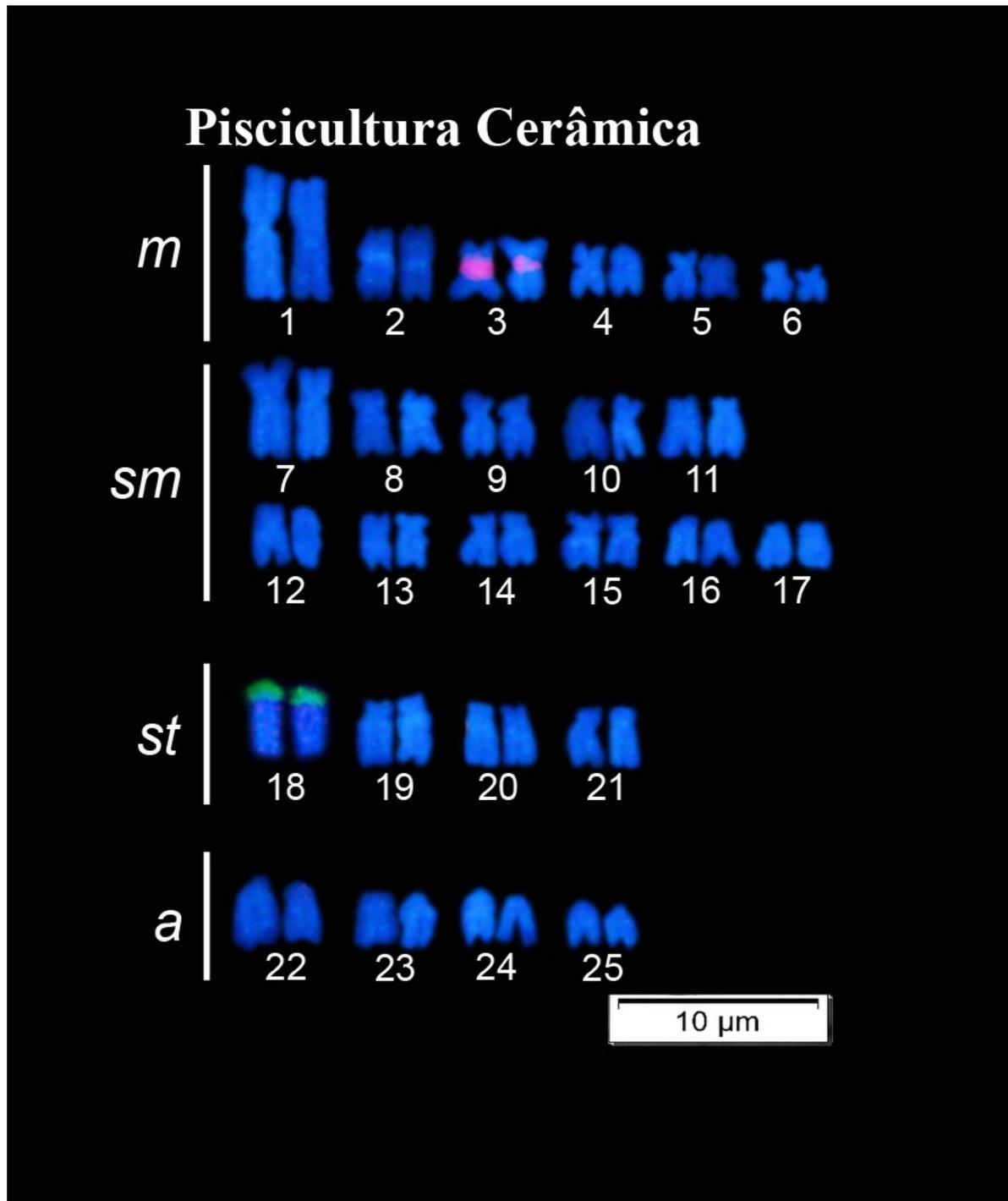


Figura 4 - Cariótipo de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*, provenientes do ponto Piscicultura Cerâmica submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e rDNA 18S (sinal verde)  
FONTE: Autoria própria.



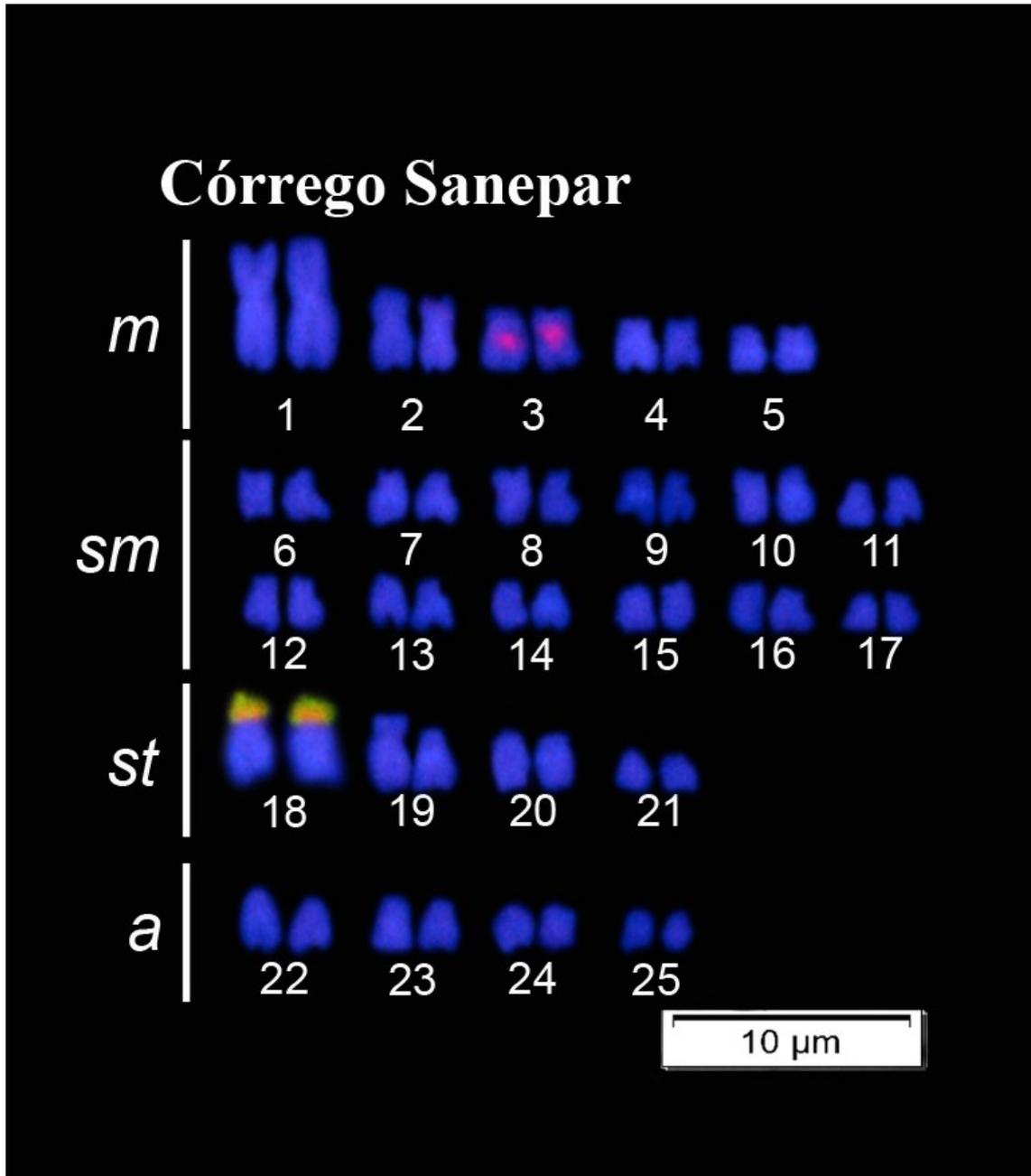


Figura 6 - Cariótipo de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*, provenientes do ponto Córrego Sanepar submetido à FISH com sondas de rDNA 5S (sinal rosa) e 18S (sinal verde)  
 FONTE: Autoria própria.

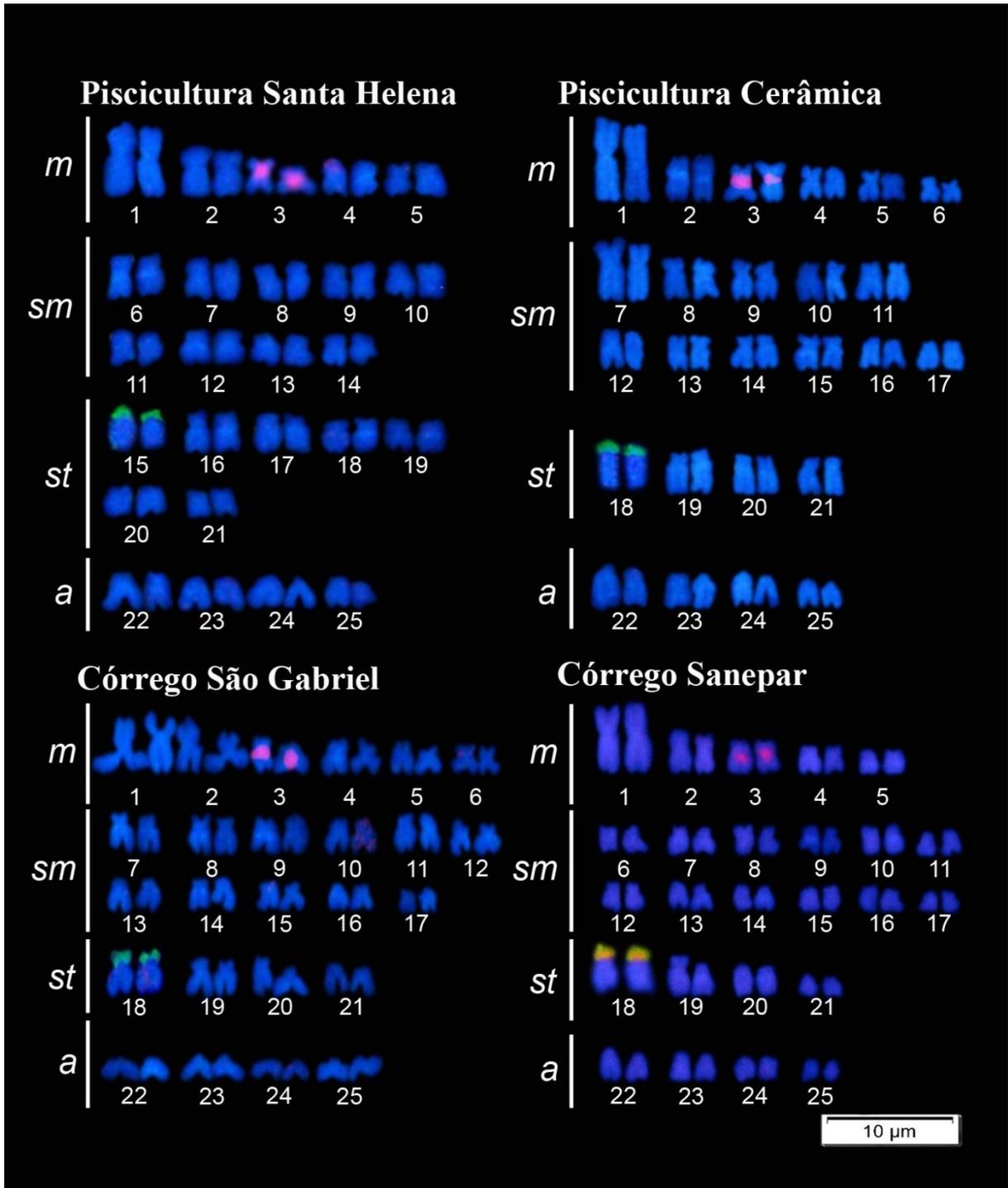


Figura 7 – Todos os cariótipos montados em uma única imagem, para fins comparativos.  
 FONTE: Autoria própria.

## 6 DISCUSSÃO

É constantemente observado em *Astyanax* um número diploide ( $2n$ ) de 50 cromossomos, como pode ser visto em *A. argyrimarginatus* (GARUTTI, 1999), *A. elachylepis* (BERTACO; LUCENA, 2006), *A. scabripinnis* (VICARI et al., 2008) *A. aff. bimaculatus*, e *A. xavante* (TENÓRIO et al., 2013). Uma grande quantidade de espécies de *Astyanax* com a característica de 50 cromossomos, pode ser um fator de importância em análises de analogias (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011), levando em consideração que este gênero não representa um complexo natural de espécies. No presente estudo, foram encontrados em todas as populações o primeiro par de cromossomos metacêntricos se sobrepondo em tamanho quando comparado aos demais cromossomos, notou-se também uma hegemonia de pares submetacêntricos (Figura 8). Na literatura este primeiro par de cromossomos é encontrado como sendo uma característica comum em *Astyanax* e também em outros gêneros de Characidae, podendo ser uma característica plesiomorfa na família (MORELLI et al., 1983; TENÓRIO et al., 2013), e uma simplesiomorfa no gênero *Astyanax* (FERREIRA-NETO et al., 2009; KAVALCO et al., 2009).

Apesar do número diploide de  $2n=50$  cromossomos, e também seu número fundamental corresponder com os encontrados na literatura, foram encontradas fórmulas cariotípicas distintas das já descritas, possivelmente sendo por conta de rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas, ou devido a possíveis hibridizações entre populações diferentes / espécies crípticas. NA literatura é encontrado que não somente uma variação cariotípica é encontrada em *Astyanax*, como também triploidismo, polimorfismos de cromatina e presença de cromossomos B (MORELLI et al., 1983; KAVALCO et al., 2007; MACHADO et al., 2012).

Com relação ao mapeamento físico, foram observadas marcações simples de rDNA 5S nas 4 populações, na posição pericentromérica no par metacêntrico 3 (Figura 8), indicando uma conservação desse par cromossômico marcado, entretanto, na população Córrego Sanepar foi encontrado um sítio adicional. Em estudos referentes à localização desse gene, são encontrados cístrons simples de rDNA 5S em populações de *A. elachylepis* Bertaco e Lucinda 2005, *A. lacustris* Lütken 1875 (PERES et al., 2008), *A. altiparanae* (FERREIRA-NETO et al., 2009), *A. xavante* (TENÓRIO et al., 2013), e *A. asuncionensis* Géry 1972 (PAIZ et al., 2015). Essa

característica que provavelmente é recorrente em *Astyanax*, corrobora com a possibilidade de haver uma estreita relação entre as populações analisadas no presente estudo. Na população Córrego Sanepar, foram observados cistrons múltiplos de rDNA 5S (Figura 8), característica também encontrada na literatura, em populações de *A. abramis* Jenyns 1842, *A. scabripinnis* (VICARI et al., 2008), *A. fasciatus* (FERREIRA-NETO et al., 2012), *A. correntinus* (PAIZ et al., 2015), entre outras já descritas.

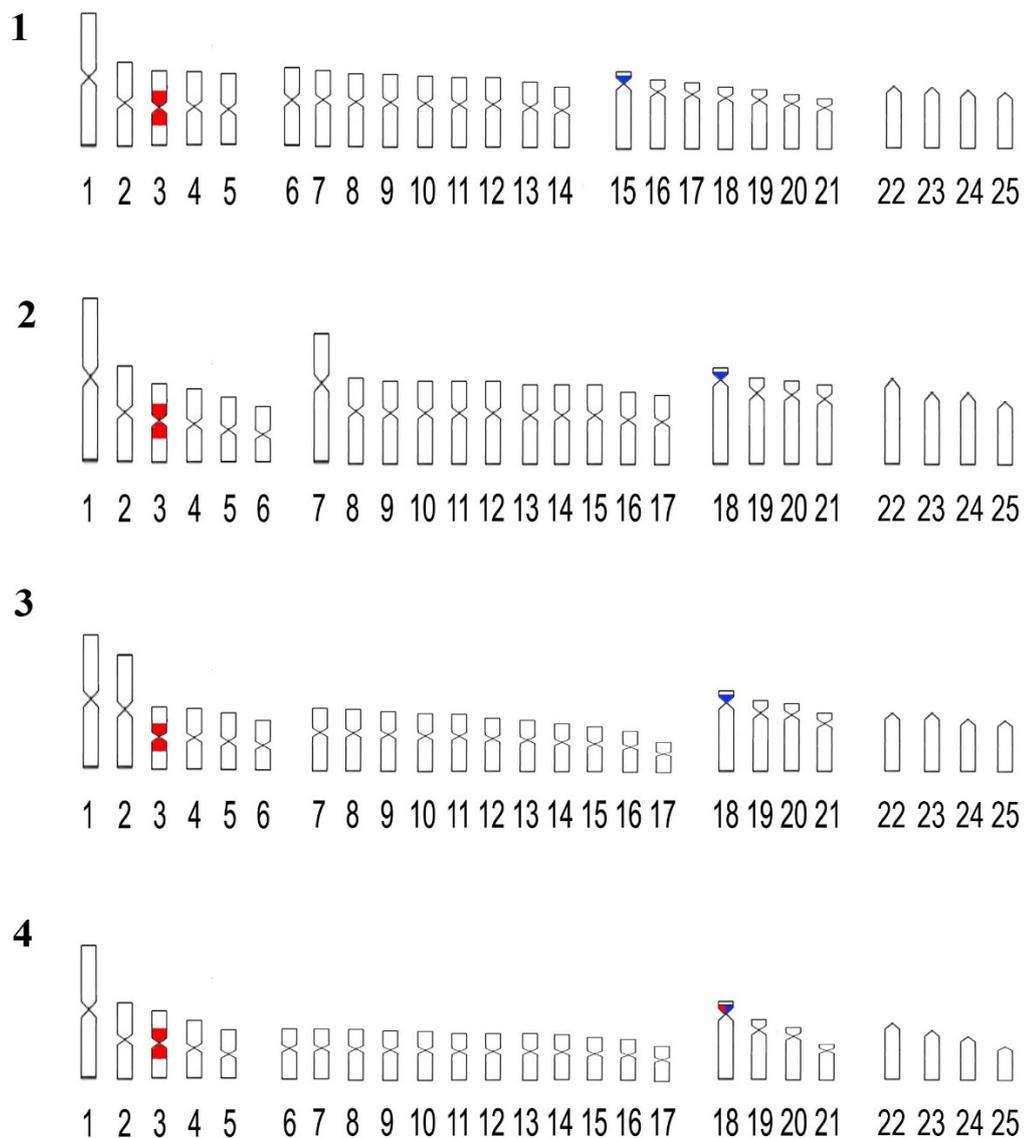


Figura 8 - Idiogramas de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*, das populações: Piscicultura Santa Helena (1), Piscicultura Cerâmica (2), Córrego São Gabriel (3) e Córrego Sanepar (4) evidenciando as marcações por rDNA 5S (vermelho) e 18S (azul)

FONTE: Autoria própria.

Em *Astyanax*, as marcações por rDNA 5S descritas em outros trabalhos, possuem tendência a serem conservados na região centromérica de um par de cromossomos metacêntricos, também são encontradas marcações em um par de cromossomos acrocêntricos, podendo ser, uma característica que se manteve conservada em de *Astyanax*, (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008); Porém existem provas de mais pares de cromossomos carregando o rDNA 5S dentro do gênero, como mostra-se em populações *A. jacuhiensis*, *A. abramis* e *A. asuncionensis* onde foram encontradas marcações em cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos (GAVAZONNI et al., 2018). No presente estudo, foram encontradas marcações de rDNA 5S em um par de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos subtlocêntricos (Figura 8). A aparente semelhança cariotípica sugestiona que existe uma relação estreita entre as populações estudadas, porém, as diferenças cariotípicas encontradas, sugerem alguma divergência de ordem evolutiva, o que pode ser devido às restrições do fluxo gênico.

Com relação às marcações por rDNA 18S, estudos realizados sugerem que uma característica comum em *Astyanax* é a ocorrência de sítios múltiplos, (FERREIRA-NETO et al., 2009; KAVALCO et al., 2011; PERES et al., 2012). Diferentemente de resultados obtidos por Gavazzoni et al. (2018) onde foram encontrados padrões de marcação simples por rDNA 18S em *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis*, *A. abramis*, e *A. asuncionensis*, sendo sempre nos primeiros pares de cromossomos acrocêntricos. Os resultados obtidos em todas as populações analisadas no presente trabalho para rDNA 18S, revelam que todos os cromossomos portadores do gene 18S são correspondentes entre as populações, sendo sempre o maior cromossomo subtlocêntrico em apenas um par de cromossomos. A partir deste dado, podemos inferir que esses sítios não são bons marcadores populacionais ou espécie/ específicos. Em estudos realizados por Pacheco et al. (2011) e Ferreira-Neto et al. (2012) puderam ser encontrados diferentes números de sítios de rDNA 18S em populações que foram outrora separadas geograficamente, como em *A. altiparanae*, sugerindo que essas variações cariotípicas estão ligadas às restrições no fluxo gênico, fixando as diferenças entre as populações (FERRO et al., 2001). Kavalco e Moreira-

Filho (2003) em seu trabalho, sugerem que essas diferenças estariam vinculadas a processos de diversificação local.

Na população Córrego Sanepar houve uma sobreposição dos cístrons no braço curto do par subtelocêntrico 18, sendo que, em todas as 4 populações são encontradas marcações do rDNA 5S sempre na posição intersticial dos cromossomos, no entanto, esse sítio adicional se encontra na posição terminal do braço curto dos cromossomos nessa população (Figura 8), abrindo espaço para questionamento da existência de um possível pseudogene. Estudos anteriores indicam uma variedade espécies de peixes possuem o gene rRNA 18S co-localizado com o gene rRNA 5S (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; HATANAKA; GALETTI, 2004; MORAES-NETO et al., 2011); porém, do ponto de vista funcional seria mais vantajoso, que essas duas classes de ribossomos estivessem em cromossomos diferentes, visto que a transcrição deles é feita por RNA polimerases distintas, e a não-sintenia seria a melhor forma de garantir que o RNAr 5S não seja translocado para o rRNA 45S (MARTINS; GALETTI, 1999), permitindo uma evolução independente desses genes (MARTINS; GALETTI, 2000). Almeida-Toledo et al. (2002) descobriram que os genes 5S e 18S rRNA estão co-localizados em cinco espécies de *Astyanax*, e tal sequência foi considerada importante para o estudo da história evolutiva do grupo, incluindo *A. altiparanae* e *A. lacustris* (sendo que *A. altiparanae* e *A. lacustris* são sinônimos). Este fato pode ser um sinal da recente separação de espécies, que anteriormente pertenciam a uma unidade taxonômica de *A. bimaculatus* (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo reforça a evidência da variedade cariotípica para *Astyanax* em relação à organização cromossômica e localização dos rDNA 5S e 18S, bem como a conservação dessas marcações em algumas regiões de pares cromossômicos. Esse estudo apresenta também a presença de uma sintenia entre os genes ribossomais 5S e 18S, sendo um dado importante para estudos da história evolutiva do grupo.

O gene rDNA5S é um bom marcador taxonômico para *Astyanax*, sendo possível sugerir que o uso desse marcador pode ser visto como uma ferramenta citotaxonômica, que pode ser utilizada para rastrear uma possível origem de duas ou mais entidades taxonômicas recentes com um ancestral em comum.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às variações encontradas, novas análises taxonômicas devem ser realizadas para confirmar se essas variações são populacionais ou tratam-se de unidades biológicas distintas, tendo também a possibilidade de polimorfismos dentro de uma mesma população, visto que *A. bimaculatus* é um complexo de espécies.

Tendo em vista os problemas de ordem taxonômica e filogenética dentro do clado *Astyanax*, esse estudo corrobora com dados de citogenética molecular para o grupo *A. bimaculatus*, e espera-se que futuramente contribua com o desenvolvimento de uma filogenia detalhada e de melhor compreensão.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. **Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Cytogenetic and Genome Research 97 (3-4): 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.
- 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.
- 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.
- FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. **Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil**. Genetics and Molecular Biology 29: 1-5. 2006.
- 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.
- FERREIRA-NETO, M., ARTONI, R. F., VICARI, M. R., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M., BAKKALI, M., *et al.* **Three sympatric karyomorphs in the fish**

***Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations.** Comparative Cytogenetics, doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.2151. 2012.

FERRO D.A.M., NEO D.M., MOREIRA-FILHO O., BERTOLLO L.A. **Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity.** Genetica. 110:55-62. 2001.

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.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by Family/Subfamily.** 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 16 mai. 19.

GALL J., PARDUE M.L. **Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 63:378-383. 1969.

GAVAZZONI, M.; PAIZ, L. M.; OLIVEIRA, C. A. M.; PAVANELLI, C. S.; GRACA, W. J.; MARGARIDO, V. P. **Morphologically Cryptic Species of the *Astyanax bimaculatus* -Caudal Peduncle Spot- Subgroup Diagnosed Through Cytogenetic Characters.** Zebrafish. v. 15, p. 382-388, 2018.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das Bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica.** Tese (livre docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. 1995.

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.

GARUTTI V., BRITSKI H.A. **Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da Bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia.** Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia. 2000.

GARUTTI, V.; LANGEANI, F. **Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. Neotropical Ichthyology 7:371-376. 2009.

**GOOGLE EARTH-MAPAS.** <https://www.google.com.br/maps>. Consulta realizada em.

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.

GRIFFITHS, A.J.; WESSLER, S.R.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T. MILLER, J.H. **Introdução à Genética.** 8a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 123, 181, 184, 192. 2006.

GROSS M.C., SCHNEIDER C.H., VALENTE G.T., et al. **Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: Chromosomal rearrangements.** Journal of Fish Biology. 2010;76: 1117-1127. DOI: 10.1111/j.1095-8649; 02550.x. 2010.

GUERRA M. FISH: **Conceitos e aplicações na citogenética.** Ribeirão Preto, SP, BR: Sociedade Brasileira de Genética; 184 pp. 2004.

HASHIMOTO D.T., FERGUSON-SMITH M.A., RENS W., FORESTI F., PORTO-FORESTI F. **Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes).** Cytogenetic and Genome Research. 134:64-71. DOI: 10.1159/000323512. 2011.

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.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. **Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin.** Caryologia, 56(4): 453-461. 2003.

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.

KAVALCO K.F., PAZZA R., ALMEIDA-TOLEDO L.F. ***Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: An ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus.** *Genetica*. 136:135-139. 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.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariopysi, Characiformes).** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP. 1993.

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.

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

MANTOVANI M. **Citogenética comparativa entre populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Paranapanema [Dissertação (Mestrado)].** Universidade Federal de São Carlos; 2001.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O. **Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).** *Genetica*. 123: 211-216. 2005.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. **Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes)**. *Chromosome Research*. 7:363-367. 1999.

MARTINS C, GALETTI PM JR. **Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes**. *Chromosome Research*. 8:353-355. 2000.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. **Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species**: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*. 44:903-910. 2001.

MARTINS C, WASKO A.P. **Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome**. In: WILLIAMS C.R, editor. *Focus on Genome Research*. Hauppauge: Nova Science Publishers. pp. 335-363. 2004.

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

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

MORAES-NETO A, SILVA M, MATOSO DA, VICARI MR, et al. **Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes)**. *Neotropical Ichthyology*. 9:97-105. 2011.

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*. 36:235–244. 1983.

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

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., *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.

PAIZ L.M., BAUMGARTNER L., GRACIA W.J., MARGARIDO V.P. **Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Parana´ River, Iguassu National Park: Considerations on taxonomy and systematics of the genus**. *Comparative Cytogenetics*; 9:54–65. 2015.

PACHECO R.B., ROSA R., GIULIANO-CAETANO L., JULIO-JR. H.F., DIAS A.L. **Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA**. *Comparative Cytogenetics*; 5:237–246. 2011.

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-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., MOREIRA-FILHO, O. **Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes)**. *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572008000200009. 2008.

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

REBORDINOS L, CROSS I, MERLO A. **High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: State of the art**. *Cytogenetic and Genome Research*. 141:103-113. 2013.

RIBEIRO, A.C.; LIMA, F.C.T.; RICCOMINI, C. MENEZES, N.A. **Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in southeastern Brazil**. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17:157-164. 2006.

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.

SILVA L.L.L., GIULIANO-CAETANO L., DIAS A.L. **Chromosome Studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, Using *in situ* Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA3 Staining**. *Folia Biologica (Krakow)*; 60:135–140. 2012.

SOUZA, I.L.; GALIANN, J.; RUA, P.DL.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. **Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes**. *Cytologia*. 66: 85-91. 2001.

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.

VALENTE G.T., MAZZUCHELLI J., FERREIRA I.A., POLETTO A.B., *et al.* **Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among Cichlid**

**fish:** New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*. 133:34- 42. DOI: 10.1159/000322888. 2011.

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.

VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R.B.; CESTARI, M.M.; CIOFFI, M.B.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. **Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes:** Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology* 76: 1094-1116. 2010.