



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA**  
**E BIOLOGIA MOLECULAR**



## **TESE DE DOUTORADO**

**Estudos cromossômicos clássicos e moleculares no complexo de  
espécies *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)**

**Juliana de Fatima Martinez**

**São Carlos**  
**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA**  
**E BIOLOGIA MOLECULAR**

**TESE DE DOUTORADO**

**Estudos cromossômicos clássicos e moleculares no complexo de**  
**espécies *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)**

**Juliana de Fatima Martinez**

**Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni**

**São Carlos**  
**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA**  
**E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Estudos cromossômicos clássicos e moleculares no complexo de espécies**

***Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)**

**Juliana de Fatima Martinez**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética e Evolução.

**Orientador:** Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho

**Co-orientador:** Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

**São Carlos**  
**2020**

Martinez, Juliana de Fatima

Estudos cromossômicos clássicos e moleculares no complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) / Juliana de Fatima Martinez -- 2020.  
88f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Orlando Moreira-Filho

Banca Examinadora: Orlando Moreira Filho,

Roberto Ferreira Artoni, Marcelo de Bello Cioffi, Luiz

Antonio Carlos Bertollo, Roberto Laridondo Lui, Josiane

Baccarin Traldi

Bibliografia

1. Citogenética de peixes. 2. Complexo de espécies. 3. Marcadores moleculares. I. Martinez, Juliana de Fatima. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Juliana de Fatima Martinez, realizada em 26/08/2020.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Karidondo Lú (Unioeste)

Profa. Dra. Josiane Baccarin Traldi (UFAM)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

*Aos meus pais, Cassia e Geraldo.*

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana” (Carl G. Jung)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, me dando coragem, força e sabedoria para seguir em frente.

Aos meus pais, Cassia e Geraldo, por todo amparo, amor, confiança e ensinamentos sobre a vida. Amo vocês!

À toda minha família, em especial aos meus irmãos Jana e Léo, meus cunhados Cesar e Ingrid pelo apoio e amor durante todos os momentos em que precisei.

Aos meus lindos e amados sobrinhos, Rafa e Davi, vocês fazem a diferença e são a razão da minha vida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Moreira Filho pela oportunidade de realizar este trabalho. Além da confiança, amizade, aprendizagem diárias, sempre fundamentais durante essa jornada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela disposição em ajudar nesse trabalho.

À minha amiga-irmã Josi, por todos esses anos de convivência, amizade, companheirismo e suporte em todos os momentos, meu exemplo de comprometimento profissional e dedicação, e que mesmo longe continua sempre presente em minha vida.

Aos amigos e colegas que passaram e aos que ainda estão no laboratório de citogenética de peixes, em especial a Geovana, que também concluiu sua jornada nesse laboratório e que sempre esteve (e ainda está!) disposta a me ajudar e apoiar no que fosse preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao meu orientador, proporcionando o desenvolvimento desse projeto.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio) pela autorização das coletas (licença Nº10538-2).

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao DBIO-So da UFSCar, meu local de trabalho, que sempre deu todo suporte durante esse período.

Aos meus amigos de trabalho da UFSCar – Campus Sorocaba, pelo apoio e convivência diária.

À todos que estão presentes em minha vida e que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho ou me ajudaram a passar por esse período de uma forma mais leve, meu muito obrigada!

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JULIANA DE FATIMA MARTINEZ** - Nasceu em 9 de dezembro de 1986, na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Iniciou sua graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas no ano de 2007 na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* de São Carlos. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq durante os anos de 2008-2010 e bolsista FAPESP (Processo 2010/09325-1) nos anos de 2010-2011, ambos sob a orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho. Em 2014 concluiu o Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, na UFSCar, com projeto desenvolvido da área de citogênica clássica e molecular de peixes, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho e co-orientação do Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui (UNIOESTE), sendo bolsista FAPESP durante esse período (Processo 2011/14960-0). Em 2016, iniciou o Doutorado no mesmo Programa e na mesma linha de pesquisa, sem bolsa de estudo, também sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho e agora sob co-orientação do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG). Durante esse período vem participando de projetos de pesquisa coordenados pelo seu orientador. Apresenta 12 artigos publicados em periódicos da área, sendo três deles como primeira autora. Participou de 16 eventos científicos e possui 35 resumos em anais de congressos. Atualmente trabalha como Técnica de laboratório/biologia no Departamento de Biologia da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Considerações gerais sobre Characiformes e Characidae.....	2
1.2. Aspectos gerais de <i>Astyanax</i> , com enfoque no complexo de espécies <i>Astyanax scabripinnis</i> .....	3
1.3. Estudos cromossômicos no complexo de espécies <i>Astyanax scabripinnis</i> .....	7
1.4. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos.....	11
1.5. Caracterização dos locais de estudo.....	15
1.5.1. Bacia do Alto rio Paraná.....	15
1.5.2. Bacia do rio Tocantins .....	16
1.5.3. Bacia do rio Paraíba do Sul .....	17
2. JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1. Metodologia Clássica.....	25
3.1.1. Indução ao aumento do número de mitoses e suspensão de levedura .....	25
3.1.2. Tratamento “ <i>in vivo</i> ” .....	25
3.1.3. Preparo de lâminas – Coloração convencional por Giemsa .....	26
3.1.4. Determinação da heterocromatina – bandamento C.....	26
3.1.5. Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo - impregnação por nitrato de prata (AgRONS).....	27
3.1.6. Estudos cariotípicos .....	27
3.2. Metodologia Molecular.....	28
3.2.1. Extração de DNA total com fenol:clorofórmio .....	28
3.2.2. Obtenção e marcação das sondas.....	29
3.2.3. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente - FISH (PINKEL et al. 1986).....	30
3.2.4. Simples Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente .....	30

3.2.5. Dupla Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente.....	32
3.2.6. Simples Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (KUBAT et al. 2008).....	34
3.2.7. Análise dos resultados.....	35
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## LISTA DE FIGURAS

### MATERIAIS e MÉTODOS

**Figura 1:** Mapa ilustrativo dos pontos de coletas e fotos das respectivas espécies coletadas em cada ponto..... 24

### RESULTADOS:

**Figura 2:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a, b), *Astyanax* cf. *intermedius* (c, d), *Astyanax* cf. *goyanensis* (e, f, g, h). Cariótipos corados com Giemsa (a, c, e, g) e posteriormente C bandados (b, d, f, h). Em caixa são apresentados os pares cromossômicos portadores de AgRONS para cada população. Barra=10µm..... 42

**Figura 3:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) e DNAr 18S (FITC – sinal verde). Em destaque (linhas) cromossomos portadores de sintenia 5S/18S. Barra=10µm..... 43

**Figura 4:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *goyanensis* (b, c) hibridados com sonda de As51(FITC – sinal verde). Barra=10µm..... 44

**Figura 5:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de snRNA U2 (FITC – sinal verde). Em caixa, ocorrência de sintenia DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) e snRNA U2 (FITC – sinal verde) em *Astyanax* cf. *intermedius*. Barra=10 µm ..... 45

**Figura 6:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de histonas H3 (FITC – sinal verde) e H4 (Rodamina – sinal vermelho). Em destaque (linhas) cromossomos portadores de sintenia H3/H4. Barra=10 µm ..... 46

**Figura 7:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *goyanensis* e *Astyanax* cf. *intermedius* hibridadas com sondas de Rex3 (FITC – sinal verde) e Rex1 (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10  $\mu$ m ..... 47

**Figura 8:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *intermedius* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, hibridadas com sonda de sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10  $\mu$ m ..... 48

**Figura 9:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *intermedius* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, hibridadas com sondas de microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (GAG)<sub>10</sub> (Cy3 – sinal vermelho) e (GATA)<sub>n</sub> (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10  $\mu$ m..... 49

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1:</b> Espécies pertencentes ao complexo <i>Astyanax scabripinnis</i> (modificada de Igenito & Duboc, 2014) .....	6
---	---

### MATERIAIS e MÉTODOS

<b>Tabela 2:</b> Espécies coletadas e suas respectivas localidades .....	23
--	----

<b>Tabela 3:</b> Sequências de DNAs repetitivos amplificados e seus respectivos <i>primers</i> .....	30
--	----

### RESULTADOS

<b>Tabela 4:</b> Número diplóide (2n), fórmulas cariotípicas e número fundamental (NF) das espécies analisadas .....	37
--	----

<b>Tabela 5:</b> Resultados da FISH com sondas de DNAr 18S e DNAr 5S para as populações analisadas.....	39
---	----

### DISCUSSÃO

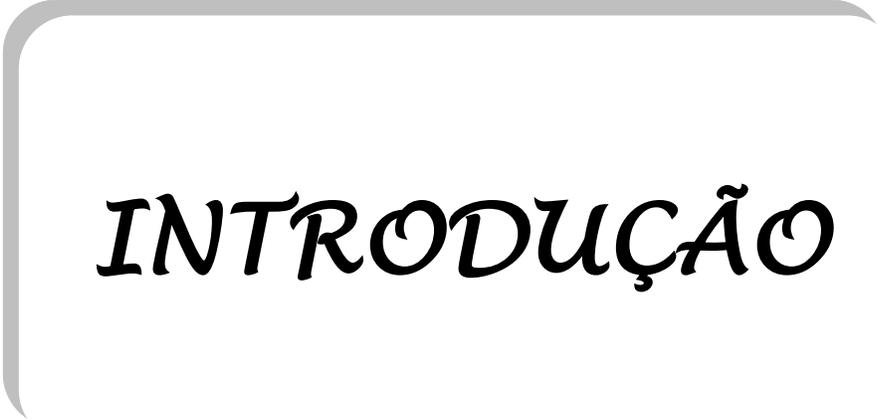
<b>Tabela 6:</b> Revisão dos trabalhos citogenéticos do complexo de espécies <i>Astyanax scabripinnis</i> .....	65
---	----

## RESUMO

*Astyanax* é um gênero de peixes pertencente à Characiformes, sendo atualmente classificado como *incertae sedis*. Dentre suas espécies encontra-se *Astyanax scabripinnis*, que é reconhecida como um complexo de espécies, o qual é composto por 33 espécies. Este estudo propôs-se a investigar a constituição cariotípica clássica e molecular de espécies desse complexo, através de análises de citogenética clássica e molecular: coloração convencional por Giemsa, bandamento C, impregnação por Nitrato de Prata e hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) com diferentes sondas de DNA repetitivos (DNAr 5S, DNAr 18S, As51, snRNA U2, H3, H4, Rex1, Rex3, sequência telomérica e microssatélites) em três espécies de diferentes bacias hidrográficas: 1) *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Alto rio Paraná); 2) *Astyanax* cf. *intermedius* (Paraíba do Sul); 3) *Astyanax* cf. *goyanensis* (Tocantins). Para esta última observou-se duas unidades ocorrendo em simpatria, sendo então considerada a presença de dois cariomorfos (A e B). As análises mostraram que as espécies possuem algumas características cromossômicas conservadas, como  $2n=50$  cromossomos, sítios teloméricos e padrão de distribuição cromossômica dos elementos repetitivos Rex1 e Rex3. Entretanto, a presença de caracteres cromossômicos variáveis se sobressai entre as espécies, mostrando diversidade no que se refere à morfologia cromossômica, padrão de bandamento C, número de sítios e localização de AgRONS, distribuição cromossômica de DNAs repetitivos (DNAr 18S e 5S, As51, snRNA U2, H3, H4 e microssatélites). Estes resultados demonstram grande diversificação da microestrutura cariotípica de espécies do complexo *Astyanax scabripinnis* e reforçam a biodiversidade existente no grupo. Além disso, os dados obtidos tem um importante papel no auxílio à taxonomia e biologia evolutiva do grupo, uma vez que revelam a presença de diferentes unidades dentro do complexo, as quais podem ser delimitadas com o auxílio citogenético, mostrando a ocorrência de características cromossômicas exclusivas de cada espécie.

## ABSTRACT

*Astyanax* is a fish genus of Characiformes and currently is classified as *incertae sedis*. *Astyanax scabripinnis*, one of these species, is recognized as a species complex, which is composed of 33 species. This study propose to investigate karyotypic constitution of species of this complex, throughout classical and molecular analyzes: conventional Giemsa staining, C-banding, impregnation with silver nitrate and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with different repetitive DNA probes (rDNA 5S, rDNA 18S, As51, snRNA U2, H3, H4, Rex1, Rex3, telomeric sequence and microsatellites in three species from different rivers basins: 1) *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Alto rio Paraná); 2) *Astyanax* cf. *intermedius* (Paraíba do Sul); 3) *Astyanax* cf. *goyanensis* (Tocantins). For the latter, two units were observed occurring in sympatry, and then the presence of two karyomorphs (A and B) was considered. The analyzes showed that the species have some conserved chromosomal characteristics, such as  $2n=50$  chromosomes, telomeric sites and chromosomal distribution pattern of repetitive elements Rex1 and Rex3. However, the presence of variable chromosomal characters stands out among the species, showing diversity regarding chromosomal morphology, C-banding pattern, number of sites and location of AgNORs, chromosomal distribution of repetitive DNAs (rDNA 18S and 5S, As51, snRNA U2, H3, H4 and microsatellites). These results demonstrate great diversification of the karyotypic microstructure of species of *Astyanax scabripinnis* complex and reinforce the biodiversity of the group. In addition, the data obtained has an important role in assisting the taxonomy and evolutionary biology of the group, since they reveal the presence of different units within the complex, which can be delimited with cytogenetic assistance, showing the occurrence of exclusive chromosomal characteristics of each species.



# *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes têm se mostrado de grande interesse para a pesquisa científica, principalmente por apresentarem grande diversidade no que se refere à sua morfologia, biologia e habitats (NELSON et al. 2016), além de possuírem uma história evolutiva longa e muitas vezes de difícil compreensão (LANGEANI et al. 2009).

Atualmente, são consideradas válidas mais de 35.500 espécies de peixes (FRICKE et al. 2020), as quais se encontram distribuídas em 85 ordens e 536 famílias (NELSON et al. 2016). Do total de espécies, 43% são predominantemente de água doce (NELSON et al. 2016) e cerca de 8.000 espécies são encontradas na região Neotropical, a qual se estende desde o sul do México até a América do Sul, sendo assim, a maior fauna de peixes de água doce conhecida (GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Das espécies ocorrentes na região Neotropical, mais de 2.600 são encontradas em território brasileiro (BUCKUP et al. 2007). Dentre estes, uma das mais intrigante e complexa história evolutiva pode ser atribuída aos pequenos peixes conhecidos como lambaris ou piabas do gênero *Astyanax*.

### 1.1. Considerações gerais sobre Characiformes e Characidae

Characiformes é uma ordem de peixes bastante diversa, e seus indivíduos podem ser localizados desde a fronteira México - Estados Unidos até o sul da Argentina, além de serem encontrados no continente africano (LUCENA, 1993). Os peixes pertencentes a esta ordem encontram-se distribuídos em 24 famílias, com cerca de 520 gêneros e aproximadamente 2300 espécies. Desse total de espécies, cerca de 200 ocorrem na África e as restantes apresentam-se distribuídas pela região Neotropical, onde atingem sua maior diversidade, representando 30% dessa ictiofauna (NELSON et al. 2016).

No que se refere ao cariótipo, os Characiformes apresentam grande variação em relação ao número diplóide, sendo encontrados desde  $2n=28$  cromossomos, verificado em *Hemigrammus* (SCHEEL, 1973), até  $2n=102$  cromossomos, observado em *Potamorhina altamazonica* (FELDBERG et al. 1993) e *Potamorhina squamoralevis* (BRASSESCO et al. 2004).

Dentre as muitas famílias pertencentes à Characiformes, uma das que mais se destaca é Characidae, devido ao alto grau de complexidade e diversidade de seus indivíduos (NELSON et al. 2016). Também é considerada a mais numerosa com cerca de 1.200 espécies distribuídas em aproximadamente 250 gêneros (FRICKE et al. 2020). Do total de gêneros, 88 deles, incluindo cerca de 620 espécies, são considerados *incertae sedis* devido à falta de dados que suportem seu monofiletismo (LIMA et al. 2003), mostrando, assim, que as relações filogenéticas da família ainda são pouco conhecidas (NELSON et al. 2016).

Os caracídeos incluem pequenos e grandes peixes popularmente conhecidos como piranhas, lambaris, pacus, dourados, piracanjuba, entre outros (LIMA et al. 2003; NELSON et al. 2016). Apresentam nadadeira caudal adiposa, sendo assim considerados bons nadadores e, além disso, apresentam grande variação no que se refere a sua reprodução, acasalamento e hábitos alimentares (BRITSKI et al. 1988).

## **1.2. Aspectos gerais de *Astyanax*, com enfoque no complexo de espécies *Astyanax scabripinnis***

*Astyanax* é um amplo gênero pertencente à Characidae. Atualmente é alocado como *incertae sedis* (LIMA et al. 2003) e composto por cerca de 140 espécies (NELSON et al. 2016). Sendo considerado o gênero mais rico em espécies de Characiformes, os indivíduos encontram-se distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (LIMA

et al. 2003). Recente revisão taxonômica com base em caracteres morfológicos e moleculares estabeleceu que o gênero *Astyanax*, como atualmente entendido, não representa um grupo monofilético (TÉRAN et al. 2020). Estes autores ainda renomearam várias espécies e indicaram clados mais estreitos entre algumas espécies das 98 estudadas, embora reconheçam que para uma filogenia definitiva é preciso considerar mais espécies e isso demanda também o aumento de caracteres na matriz de dados.

*Astyanax*, popularmente conhecidos como lambaris ou piabas, compreendem peixes pequenos e não migratórios, com nadadeira adiposa quase sempre presente; linha lateral completa e pouca curva na frente; dentes pré maxilares dispostos em duas séries, sendo a interna composta por cinco dentes; pré maxilar não protátil; dentes com cúspides; altura do corpo até três vezes o comprimento padrão e escamas de tamanho normal, cobrindo somente a base dos raios da nadadeira caudal (BRITSKI et al. 1988).

De acordo com Pazza & Kavalco (2007), somente 15% das espécies de *Astyanax* já foram caracterizadas citogeneticamente, sendo essa porcentagem possivelmente já subestimada. O grupo mostra-se bastante diverso, com número diplóide variando de  $2n=36$  até  $2n=50$  cromossomos, sendo  $2n=50$  o mais frequente (MORELLI et al. 1983; PAZZA & KAVALCO, 2007). Devido à alta variabilidade tanto cariotípica quanto morfológica encontrada no grupo, vários autores propõem a existência de diferentes complexos de espécies, como: *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax fasciatus* e *Astyanax scabripinnis* (GARUTTI, 1995; MELO 2005; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991, respectivamente).

Moreira-Filho & Bertollo (1991) encontraram grande diversidade tanto em relação a caracteres morfológicos quanto cromossômicos em diferentes populações de *Astyanax* analisadas. Levando em consideração que *A. scabripinnis* apresenta um padrão de

distribuição restrito a cabeceiras de rios, com plasticidade fenotípica e diferenciação morfológica em uma mesma bacia hidrográfica, os autores propuseram que *A. scabripinnis* trata-se possivelmente de um complexo de espécies e não de uma única espécie em particular. Em revisão mais recente, Ingenito & Duboc (2014) apresentaram 29 espécies pertencentes ao complexo *A. scabripinnis*, entretando novas espécies foram descritas, e atualmente 33 espécies encontram-se alocadas dentro do complexo (Tab. 1).

**Tabela 1:** Espécies pertencentes ao complexo *Astyanax scabripinnis* (modificada de Ingenito & Duboc, 2014).

<b>Espécie</b>	<b>Autor</b>	<b>Espécie</b>	<b>Autor</b>
<i>Astyanax brachypterygium</i>	Bertaco & Malabarba, 2001	<i>Astyanax microschemos</i>	Bertaco & Lucena, 2006
<i>Astyanax burgeri</i>	Zanata & Camelier, 2009	<i>Astyanax obscurus</i>	(Hensel, 1870)
<i>Astyanax courensis</i>	Bertaco, Carvalho & Jerep, 2010	<i>Astyanax ojiara</i>	Azpelicueta & Garcia, 2000
<i>Astyanax cremnobates</i>	Bertaco & Malabarba, 2001	<i>Astyanax paranae</i>	Eigenmann, 1914
<i>Astyanax epiagos</i>	Zanata & Camelier, 2008	<i>Astyanax paris</i>	Azpelicueta, Almirón & Casciotta, 2002
<i>Astyanax eremus</i>	Ingenito & Duboc, 2014	<i>Astyanax pirabitira</i>	Lucena, Bertaco & Berbigier, 2013
<i>Astyanax goyanensis</i>	(Miranda-Ribeiro, 1944)	<i>Astyanax pirapuan</i>	Tagliacollo, Britzke, Silva & Benine, 2011
<i>Astyanax guaricana</i>	Oliveira, Abilhoa & Pavanelli, 2013	<i>Astyanax rivularis</i>	(Lütken, 1875)
<i>Astyanax gymnogenys</i>	Eigenmann, 1911	<i>Astyanax rupestris</i>	Zanata, Burger & Camelier, 2018
<i>Astyanax intermedius</i>	Eigenmann, 1908	<i>Astyanax scabripinnis</i>	(Jenyns, 1842)
<i>Astyanax ita</i>	Almirón, Azpelicueta & Casciotta, 2002	<i>Astyanax serratus</i>	Garavello & Sampaio, 2010
<i>Astyanax jacobinae</i>	Zanata & Camelier, 2008	<i>Astyanax sincora</i>	Burger, Carvalho & Zanata, 2019
<i>Astyanax jenynsii</i>	(Steindachner, 1877)	<i>Astyanax totae</i>	Haluch & Abilhoa, 2005
<i>Astyanax jordanensis</i>	Alcaraz, Pavanelli & Bertaco, 2009	<i>Astyanax troya</i>	Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002
<i>Astyanax laticeps</i>	(Cope, 1894)	<i>Astyanax turmalinensis</i>	Triques, Vono & Caiafa, 2003
<i>Astyanax leonidas</i>	Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002	<i>Astyanax varzeae</i>	Abilhoa & Duboc, 2007
<i>Astyanax lorien</i>	Zanata, Burger & Camelier, 2018		

### 1.3. Estudos cromossômicos no complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*

A denominação de *Astyanax scabripinnis* como complexo de espécies foi proposta por Moreira-Filho & Bertollo (1991), com base no estudo de 7 populações provenientes de riachos de diferentes ou de uma mesma bacia. A análise realizada demonstrou grande diversidade tanto em relação a caracteres morfológicos quanto cromossômicos, com número diplóide variando entre  $2n=46$ , 48 e 50 cromossomos, estrutura cariotípica, principalmente relacionada ao número de cromossomos acrocêntricos presentes nas populações e distribuição de heterocromatina. Toda essa heterogeneidade encontrada entre populações sendo consideradas como uma mesma espécie levou os autores a proporem que se tratasse não de uma única espécie, mas sim de um complexo de espécies de *A. scabripinnis*.

Muitos estudos corroboraram com a proposta de Moreira-Filho & Bertollo (1991). Em relação ao número diplóide,  $2n=50$  é o mais frequentemente encontrado (MORELLI et al. 1983; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO et al. 1992, 1994a, 1994b; 1998, 2000; 2001; FAUAZ et al. 1994; SOUZA et al. 1995, 2007; VICENTE et al. 1996; PORTO-FORESTI et al. 1997; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS 1997, 1998a, 1998b; MESTRINER et al. 2000; MANTOVANI et al. 2000, 2004, 2005; NÉO et al. 2000a, 2000b; FERRO et al. 2001; MOREIRA-FILHO et al. 2001; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001; KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2005, 2006; SANTOS & MORELLI, 2006; ABEL et al. 2006; KAVALCO et al. 2007; BIAVITI & MAISTRO, 2007; VICARI et al. 2008, 2011; KANTEK et al. 2008; DA ROSA et al. 2009; SANTOS et al. 2012a, 2012b; CASTRO et al. 2014, 2015; SILVA et al. 2014, 2015; BARBOSA et al. 2015, 2017; TEIXEIRA et al. 2018), contudo variações podem ser

observadas, como  $2n=46$  (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2005, 2006; MANTOVANI et al. 2005; ABEL et al. 2006) e  $2n=48$  (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA et al. 1995, 1996; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998a, 1998b; MAISTRO et al. 2000; MANTOVANI et al. 2000, 2004; SOUZA et al. 2001; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2003, 2005, 2006; CRISTINA et al. 2003; ABEL et al. 2006; VICARI et al. 2008; YANO et al. 2014; CASTRO et al. 2015). Além disso, a estrutura cariotípica entre as populações estudadas apresenta grande variação. A ocorrência de espécimes triploides naturais também já foi relatada para o grupo (FAUAZ et al. 1994; MAISTRO et al. 1994b; CRISTINA et al. 2003; SANTOS et al. 2012b).

A heterocromatina, verificado pelo bandamento C, evidencia um padrão típico, com blocos proeminentes em posição terminal nos braços longos de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (MAISTRO et al. 1992, 1994a; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997; MESTRINER et al. 2000; MANTOVANI et al. 2000; FERRO et al. 2001; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2003, 2005; CRISTINA et al. 2003; SANTOS & MORELLI, 2006; SANTOS et al. 2012a, 2012b; SILVA et al. 2014), podendo ocorrer heteromorfismo desses blocos heterocromáticos entre os cromossomos homólogos (MANTOVANI et al. 2000; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2003). Além disso, o padrão de distribuição de heterocromatina nos cromossomos pode até mesmo ser característico para cada população (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; MAISTRO et al. 1994a, 1998, 2000; BIAVITI & MAISTRO, 2007; SANTOS et al. 2012b).

No que se refere à Região Organizadora de Nucléolo (RON), a condição de sítios múltiplos é a mais frequente, podendo-se observar variação em relação ao número e

posição desses sítios em diferentes tipos cromossômicos (MAISTRO et al., 1992, 1994a, 2000; MANTOVANI et al. 2000; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2003, 2005; KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; CRISTINA et al. 2003; SANTOS & MORELLI, 2006; BIAVITI & MAISTRO, 2007; SOUZA et al. 2007; VICARI et al. 2008; DA ROSA et al. 2009; SANTOS et al. 2012a, 2012b; SILVA et al. 2014). Contudo casos de RON simples também já foram observados (MESTRINER et al. 2000; MAISTRO et al. 2000, 2001; SANTOS et al. 2012b; BARBOSA et al. 2015, 2017). A presença de um sítio terminal no braço curto de um par subtelocêntrico, é encontrado com frequência, podendo assim, se tratarem de cromossomos homeólogos entre diferentes populações (MANTOVANI et al. 2000) e importante marcador para a espécie (MAISTRO et al. 2000).

O mapeamento físico de sequências de DNAs repetitivos nos cromossomos pela Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), foi realizado principalmente com sondas de DNA ribossômico 45S e 5S, mostrando variação de cromossomos portadores desses cístrons entre as populações estudadas (FERRO et al. 2001; SOUZA et al. 2001; KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; CRISTINA et al. 2003; MANTOVANI et al. 2005; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2006; VICARI et al. 2008, 2011; DA ROSA et al. 2009; SANTOS et al. 2012a; CASTRO et al. 2014, 2015; SILVA et al. 2014, 2015; BARBOSA et al. 2015, 2017; TEIXEIRA et al. 2018).

Outras sondas de DNAs repetitivos ainda não foram amplamente exploradas, contudo algumas já foram utilizadas para mapeamento físico dos cromossomos de diferentes populações como: sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (FERRO et al. 2003; BARBOSA et al. 2017), sequência de DNA satélite As51 (MESTRINER et al. 2000; MANTOVANI et al. 2004, ABEL et al. 2006; KAVALCO et al. 2007; VICARI et al. 2011;

BARBOSA et al. 2015, 2017), histonas H1, H3 e H4 (SILVA et al. 2014, 2015; BARBOSA et al. 2017), snRNA U1 e U2 (SILVA et al. 2015), além de alguns tipos de microssatélites (BARBOSA et al. 2017) e dos elementos transponíveis Rex1 e Rex3 (SILVA et al. 2014).

Outra característica marcante do grupo é a presença de cromossomos Bs, os quais são variáveis em número e morfologia, sendo que o mais frequentemente encontrado é o B do tipo metacêntrico grande, semelhante ao primeiro par dos cariótipos (SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO et al. 1992, 1994a, 2001; PORTO-FORESTI et al. 1997; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997, 1998; MESTRINER et al. 2000; NÉO et al. 2000; FERRO et al. 2001, 2003; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005; VICENTE et al. 2006; KANTEK et al. 2008; SANTOS et al. 2012a, 2012b; CASTRO et al. 2014; SILVA et al. 2014; BARBOSA et al. 2015). Entretanto, outras morfologias foram encontradas com menos frequência, como: metacêntrico pequeno (NÉO et al. 2000; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002; FERRO et al. 2003); submetacêntrico grande (NÉO et al. 2000; FERRO et al. 2003; SILVA et al. 2014); subtelocêntrico grande (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005); acrocêntrico grande (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005) e microcromossomos (MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997).

Diferenças no padrão de distribuição de heterocromatina nesses cromossomos adicionais podem ser observadas, sendo eles totalmente heterocromáticos (SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO et al. 1992, 2001; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997; NÉO et al. 2000; FERRO et al. 2003; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005; SANTOS et al. 2012a 2012b; CASTRO et al. 2014) ou parcialmente heterocromáticos (SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997; MESTRINER et al. 2000; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005).

Os cromossomos Bs também podem estar presentes em 100% das metáfases analisadas (SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS et al. 1997, 1998; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005; SILVA et al. 2014) ou apenas em um dos sexos (MAISTRO et al. 1992, 1994; ALVES et al. 2002). Além disso, também já foram encontrados sítios de DNAs repetitivos nesses cromossomos, como rDNA 45S, histona H1 (SILVA et al. 2014) e As51 (BARBOSA et al. 2017).

*Astyanax scabripinnis* apresenta também importante proporção de indivíduos intersexos com ocorrência de hermafroditismo funcional, com possível inversão tanto para machos quanto para fêmeas, esse fato possivelmente está ligado a fatores ambientais, tais como temperatura e densidade populacional, entretanto não relação entre a ocorrência de reversão sexual e cromossomos Bs (CORNELIO et al. 2017; CIOFFI et al. 2018).

#### **1.4. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos**

No genoma de organismos eucariotos é comum a presença de uma grande quantidade de sequências repetitivas de DNA (MARTINS et al. 2011; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Apresentando-se de tamanhos variados, esses segmentos podem estar repetidos de dezenas a milhares de vezes no genoma, podendo estar distribuídos em *tandem* (lado a lado) ou dispersos pelo genoma (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). As sequências que se repetem em *tandem* são subdivididas de acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, sendo classificadas em DNA microsatélite, minissatélite e satélite. Por sua vez, os elementos transponíveis (TEs) são sequências que se apresentam dispersas pelo genoma e possuem a capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma (CHARLESWORTH et al. 1994; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) contém de 1 a 6 pares de base (pb), repetidas de 5 a 100 vezes em cada locus (EPPLEN & EPPLEN-HAUPT, 2002), e participam da organização da cromatina, replicação e recombinação do DNA e regulação da atividade gênica (LI et al. 2002). Essas sequências são frequentemente distribuídas ao acaso pelo genoma e possuem elevado grau de polimorfismo, sendo que devido a essa alta variabilidade, seu uso como marcador molecular tem crescido consideravelmente, sendo úteis na caracterização de diferentes populações (MARTINS et al. 2011).

Minissatélites possuem de 9 a 100 pb e apresentam-se repetidos no genoma de 2 a centenas de vezes por locus (EPPLEN & EPPLEN-HAUPT, 2002). Para muitas classificações de sequências em *tandem*, o DNA telomérico é comumente considerado um minissatélite (FAJKUS et al. 2008). Telômeros são sequências de DNA encontradas na região terminal dos cromossomos (MCEACHERN et al. 2000) e sua função básica é manter a integridade e estabilidade cromossômica (BLACKBURN, 2001). Todos os vertebrados apresentam esse tipo de repetição de sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>. A utilização desse tipo de sequência vem sendo importante na detecção de rearranjos em diversos grupos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas onde pode ser detectada a presença de ITS (Interstitial Telomeric Sequences).

DNAs satélites são sequências maiores e possuem repetições de 100 a 1000 pb presentes em até 10<sup>7</sup> cópias por genoma (EPPLEN & EPPLEN-HAUPT, 2002). Na maioria dos casos, essas regiões encontram-se alocadas preferencialmente na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos (CORRADINI et al. 2007; ROSSI et al. 2007). Contudo, também há descrição desse tipo de DNA em região telomérica e intersticial (ADEGA et al. 2007; MELES et al. 2008). Ocasionalmente, alguns genes podem ser

encontrados intercalados com essas regiões, sem que ocorra sua inativação (PIMPINELLI et al. 1986; LOHE & HILLIKER, 1995).

As famílias multigênicas são outra classe de DNA repetitivo organizada em *tandem* e exibem essa denominação por agrupar conjuntos de DNAs que geralmente exibem similaridades tanto estruturais quanto funcionais, além de serem descendentes de um gene ancestral comum (NEI & ROONEY, 2005; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Dentro desta classe, estão inclusos os genes de histonas, DNA ribossomais e os genes de snRNA (MARTINS et al. 2011; VALADKHAN, 2005).

As histonas são codificadas por famílias que variam entre 100 e 1.000 genes (GRIFFITHS et al. 2006). São classificadas em histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 e estão envolvidas na compactação do DNA para formação do nucleossomo. A estrutura dessas proteínas é altamente conservada entre as diversas classes de animais, principalmente H3 e H4, embora variações já tenham sido encontradas (MARTINS et al. 2011).

As sequências de DNA ribossomais (DNAr) são amplamente utilizadas, e de suma importância na grande maioria dos eucariotos por desempenharem um papel indispensável na síntese proteica, constituindo as principais estruturas dos ribossomos. Apresentam-se organizados em *tandem* em dois grupos distintos: DNAr 45S e DNAr 5S. O arranjo maior é constituído pelos genes que transcrevem os RNAs ribossomais (RNAr) 18S, 5,8S e 28S. O arranjo menor é formado pelas sequências de genes que transcrevem o RNAr 5S, e é transcrita por uma sequência de aproximadamente 120 pb, sendo altamente conservada (MARTINS et al. 2011; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

Os snRNA (Small Nuclear RNA) são um subconjunto de pequenos RNAs que podem ser encontradas no núcleo. São subdivididos em cinco tipos: U1, U2, U4, U5 e U6 e compõem a maquinaria do spliceossomo, atuando na remoção dos íntrons do pré-RNA

durante o processo de splicing (VALADKHAN, 2005; UTSUNOMIA et al. 2014). O mapeamento cromossômico dos genes de U1 e U2 vem evidenciando cenários variáveis, podendo essas sequências apresentarem-se clusterizadas em um ou mais pares cromossômicos, além de poderem exibir formas dispersas (ÚBEDA-MANZARANO et al. 2010).

As sequências dispersas são compostas por elementos transponíveis que possuem capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma. São classificadas em transposons, os quais se propagam a partir de moléculas de DNA, e retrotransposons, que necessitam da ação de uma transcriptase reversa para se propagarem. Estes últimos são subdivididos em duas categorias: os longos elementos intercalares (LINEs – Long Interspersed Elements) e os elementos curtos intercalados (SINEs – Short Interspersed Elements) (GRIFFITHS et al. 2006; MARTINS et al. 2011).

A análise de diferentes classes de elementos repetitivos vem sendo cada vez mais utilizada na citogenética de peixes e, para o complexo *Astyanax scabripinnis*, os trabalhos envolvendo o mapeamento físico dos cromossomos com sondas de DNAs repetitivos se concentram mais nos DNAs ribossômicos 45S e 5S, e poucos estudos exploraram outras classes de DNA repetitivos até o momento. Desta forma, é de grande importância desenvolver mais estudos de citogenética molecular para entender como diferentes classes de DNAs repetitivos, comumente estudados no genoma de peixes, como, histonas, sequência telomérica, microssatélites e outros TEs, além dos rDNA 45S e 5S, que apresentam grande variabilidade no grupo, estão distribuídos no seu genoma.

## **1.5. Caracterização dos locais de estudo**

Cerca de 70% da superfície global é constituída por água, correspondendo ao recurso natural de maior abundância. Contudo, 97,5% desse total correspondem a oceanos e mares, e apenas 2,5% são de água doce, e somente uma pequena fração dessa água é encontrada em rios e lagos (REBOUÇAS, 2008). O Brasil é dotado de uma vasta e densa rede hidrográfica, possuindo 12% do total mundial de água doce e representando 53% da produção de água doce do continente americano, encontrando-se dividido em doze regiões hidrográficas, sendo elas: Amazônica, Tocantins/Araguaia, Atlântico NE Ocidental, Parnaíba, Atlântico NE Oriental, São Francisco, Atlântico Leste, Atlântico Sudeste, Paraná, Paraguai, Uruguai e Atlântico Sul (ANA, 2020a).

### **1.5.1. Bacia do Alto rio Paraná**

O Paraná é o segundo maior rio em extensão da América do Sul e o décimo maior do mundo, com 4.695 Km, sendo considerado o principal rio da bacia do Prata (AGOSTINHO et al. 2004). Percorre cerca de 3.809 Km desde sua nascente na Serra da Mata da Corda (MG), onde é formado pela junção do rio Grande e Parnaíba, até sua desembocadura no rio da Prata, drenando uma área que corresponde a 10,5% do território brasileiro (AGOSTINHO & JÚLIO Jr., 1999).

No Brasil, o rio Paraná é dividido em duas regiões: o Alto rio Paraná, que vai desde sua nascente até a usina de Itaipu; e o Baixo rio Paraná, que corresponde à região posterior a essa barragem. O Alto rio Paraná corresponde aproximadamente ao primeiro terço da bacia do rio Paraná e está situado inteiramente em território brasileiro, com exceção de uma área dentro do reservatório de Itaipu, o qual faz fronteira com o Paraguai (AGOSTINHO et al. 2004).

Para a bacia do Alto rio Paraná, 310 espécies de peixes são descritas, encontrando-se alocadas em 11 ordens e 38 famílias. Destas, 80% pertencem às ordens Siluriformes e Characiformes (LANGEANI et al. 2007).

### **1.5.2. Bacia do rio Tocantins**

O rio Tocantins apresenta aproximadamente 2.400 Km de extensão, sendo considerado o segundo maior curso d'água inteiramente brasileiro, ficando atrás somente do rio São Francisco. O Tocantins tem sua nascente localizada na Serra Paranã, entre os municípios de Ouro Verde de Goiás e Petrolina de Goiás, ambos no estado de Goiás, e a partir daí percorre toda sua extensão atravessando os estados de Tocantins, Maranhão e tendo sua foz localizada em Belém, no Pará (ANA, 2020b).

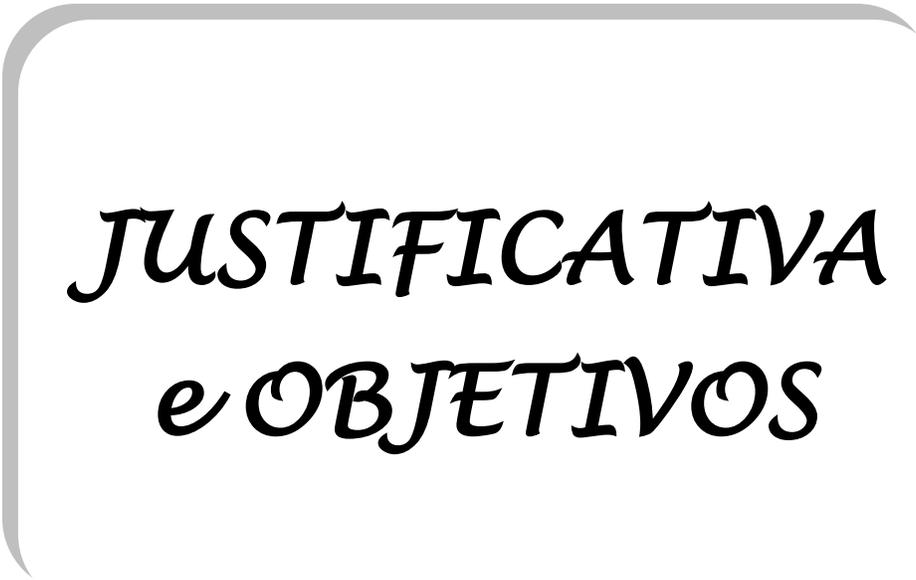
A bacia do rio Tocantins abrange cerca de 750.000 Km (GOULDING et al. 2003). Por se encontrar com o rio Araguaia entre os estados do Tocantins e Pará, pode ser chamado também de rio Tocantins-Araguaia, formando a área de drenagem inteiramente em território brasileiro conhecida como Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia (ANA, 2020b). Antes da confluência com o Araguaia, as águas do rio Tocantins caracterizam-se pela presença de cachoeiras e corredeiras (INNOCÊNCIO, 1989).

A ictiofauna da bacia do Tocantins é considerada bem conhecida, devido a levantamentos ictiofaunísticos realizados para a construção de hidrelétricas, sendo encontradas pelo menos 520 espécies de peixes, sendo cerca de 30% consideradas endêmicas da bacia (LIMA & CAIRES, 2011)

### **1.5.3. Bacia do rio Paraíba do Sul**

A bacia do rio Paraíba do Sul encontra-se situada na região sudeste do Brasil, com uma área total de 55.500 Km<sup>2</sup>, abrangendo os estados de São Paulo (13.900 Km<sup>2</sup>), Minas Gerais (20.700 Km<sup>2</sup>) e Rio de Janeiro (20.900 Km<sup>2</sup>). O Paraíba do Sul é o principal rio da bacia e resulta da confluência dos rios Paraibuna e Paraitinga, no estado de São Paulo, enquanto sua foz situa-se no Norte Fluminense, no estado do Rio de Janeiro. O percurso desde sua nascente até a sua foz supera 1.100 Km<sup>2</sup>. Os seus principais afluentes pela margem esquerda são: rios Jaguari, Paraibuna, Pomba e Muriaé, enquanto a margem direita tem como afluentes os rios Piraí, Piabanha e Dois Rios. Essa bacia encontra-se subdividida em quatro sub-bacias: Alto Paraíba do Sul, Baixo Paraíba do Sul, Muriaé/Pomba e Paraibuna (ANA, 2020c).

Em relação a sua ictiofauna, há registro da ocorrência de cerca de 200 espécies, sendo 160 espécies de água doce no rio Paraíba do Sul e o restante encontra-se na área do estuário, junto ao Oceano Atlântico. Espécies exóticas são comumente encontradas, como dourado, tilápias e tucunarés. Os peixes mais encontrados pertencem a Siluriformes, seguidos pelos Characiformes, Cyprinodontiformes, Perciformes e Synbranchiformes (HILSDORF & PETRERE Jr., 2002).



*JUSTIFICATIVA  
e OBJETIVOS*

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos envolvendo tanto a citogenética clássica quanto a molecular vêm sendo cada vez mais utilizados em populações naturais de peixes Neotropicais de água doce. A associação das informações obtidas a partir de diferentes marcadores tem gerado importantes informações sobre modificações da estrutura cromossômica, assim como auxiliado na investigação de problemas de ordem taxonômica e evolutiva.

Não obstante, diferentes classes de DNAs repetitivos têm sido mapeadas sobre os cromossomos com o objetivo de elucidar questões relacionadas à identificação de cromossomos sexuais, evoluções cromossômicas e problemáticas taxonômicas de grandes e pequenos grupos de peixes.

Considerando que *A. scabripinnis* apresenta-se como um complexo de espécies, possuindo alta diversidade cariotípica e morfológica (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991), este estudo propôs-se a investigar a constituição cariotípica em diferentes espécies pertencentes a esse complexo e identificar a localização cromossômica de marcadores moleculares ainda pouco explorados no grupo, com o intuito de estabelecer o grau de conservação ou divergência evolutiva entre essas espécies no que se refere à sua macro e microestrutura cariotípica, e suas inter-relações e relações com grupos próximos, buscando, assim, aumentar o nível de compreensão a cerca da real dimensão da diversidade que envolve esse complexo de espécies, além de gerar dados que contribuam com o conhecimento da biologia evolutiva do grupo e com potencial de auxiliar nas problemáticas taxonômicas que o envolvem.

Para tanto, foram desenvolvidos:

- Procedimentos citogenéticos clássicos (coloração convencional por Giemsa, bandamento-C e impregnação por Nitrato de Prata);

- Mapeamento citogenético de sequências de DNAs repetitivos já descritos na literatura: (rDNA 18S, rDNA 5S, As51, snRNA U2, Histonas H3 e H4, Rex1, Rex3, seqüência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> e os microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (GAG)<sub>10</sub> e (GATA)<sub>n</sub>;
- Análises comparativas dos dados obtidos entre as diferentes espécies analisadas e com aqueles já disponíveis na literatura.



*MATERIAIS e  
MÉTODOS*

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados exemplares de três populações pertencentes ao complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*, provenientes de localidades distintas: 1) ribeirão dos Negros, bacia do Alto rio Paraná, no município de São Carlos-SP; 2) ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, no município de Pindamonhangaba-SP; 3) ribeirão das Brancas, bacia do rio Tocantins, no município de Água Fria de Goiás – GO. Todos os exemplares foram identificados pelo Dr. Vinícius Abilhoa, como pertencentes às espécies *Astyanax* aff. *scabripinnis* (ribeirão dos Negros), *Astyanax* cf. *intermedius* (ribeirão Grande) e *Astyanax* cf. *goyanensis* (ribeirão das Brancas). Exemplares testemunhos foram depositados na coleção de ictiologia do Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná (Fig. 1; Tab. 2).

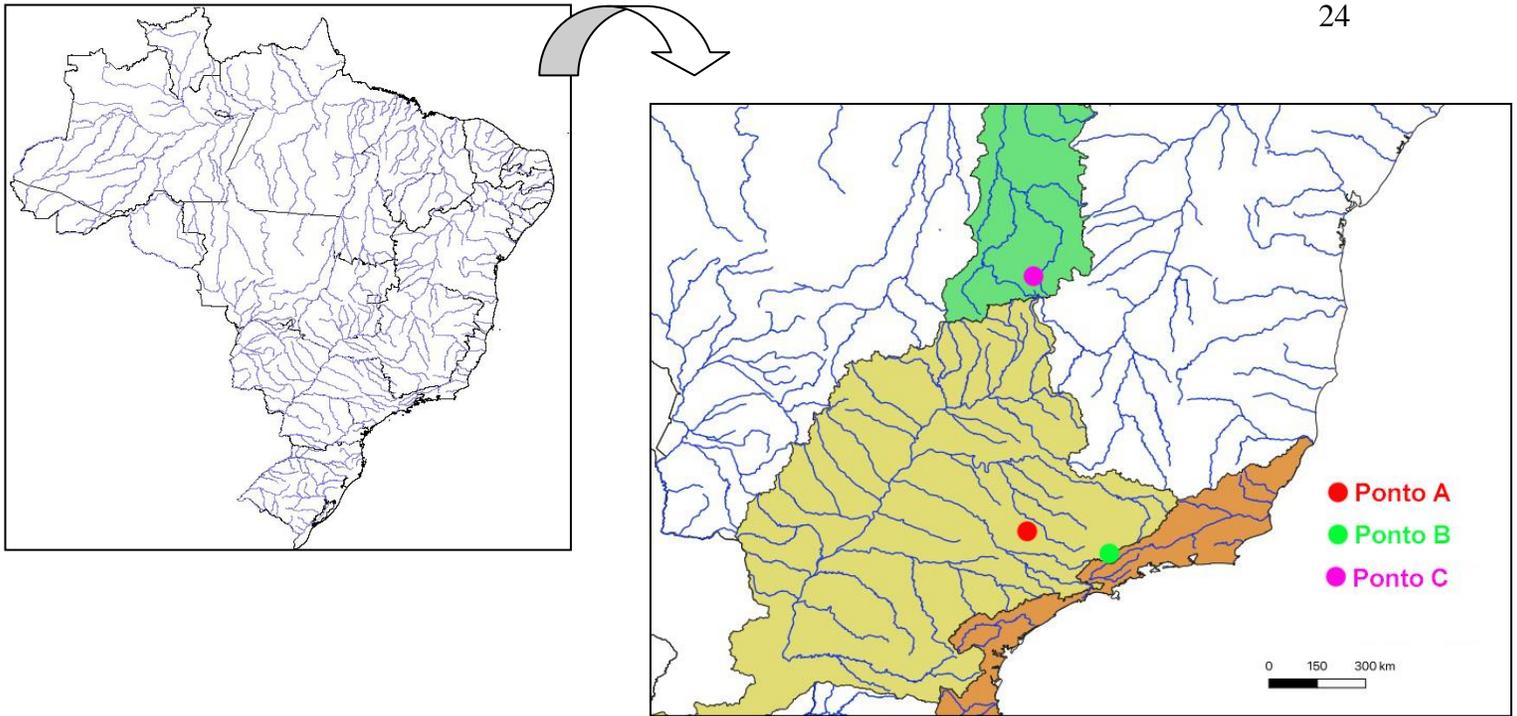
Todos os procedimentos seguiram condutas éticas, de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo n.º. CEUA 1853260315) e as coletas foram executadas com a autorização emitida pelo IBAMA/ICMBio (n.º10538-2).

Para a captura dos exemplares foram utilizadas peneiras e tarrafas, e os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o laboratório de Citogenética de Peixes, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos.

**Tabela 2:** Espécies coletadas e suas respectivas localidades.

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Município</b>	<b>Bacia</b>	<b>GPS</b>	<b>Exemplares analisados</b>	<b>Depósito</b>	<b>Localização no mapa</b>
<i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i>	Ribeirão dos Negros	São Carlos (SP)	Alto rio Paraná	22°02'20.44"S 47°46'58.21"O	10♀/5♂	MHNCI 13005	A
<i>Astyanax</i> cf. <i>intermedius</i>	Ribeirão Grande	Pindamonhang aba (SP)	Paraíba do Sul	22°47'8"S 45°27'19"O	5♀/7♂	MHNCI 13009	B
<i>Astyanax</i> cf. <i>goyanensis</i>	Ribeirão das Brancas	Água Fria de Goiás (GO)	Tocantins	14°57'7.8"S 47°35'57.3"O	10♀/3♂	MHNCI 13010	C

\***SP** Estado de São Paulo; **GO** Estado de Goiás; **S** Sul; **O** Oeste



**Ponto A:** Ribeirão dos Negros - São Carlos/SP (Bacia do Alto rio Paraná)

*Astyanax aff. scabripinnis*



**Ponto B:** Ribeirão Grande – Pindamonhangaba/SP (Bacia do rio Paraíba do Sul)

*Astyanax cf. intermedius*



**Ponto C:** Ribeirão das Brancas – Água Fria de Goiás/GO (Bacia do rio Tocantins)

*Astyanax cf. goyanensis*



**Figura 1:** Mapa ilustrativo dos pontos de coletas e fotos das respectivas espécies coletadas em cada ponto

Foram realizadas as seguintes técnicas de citogenética:

### **3.1. Metodologia Clássica**

#### **3.1.1. Indução ao aumento do número de mitoses e suspensão de levedura**

Para obtenção de uma melhor qualidade na análise cromossômica, fez-se necessário a aquisição mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Uma vez que o rim anterior possui função hematopoiética, ou seja, produz células sanguíneas, tanto as de defesa como as de transporte de  $O_2/CO_2$ , foi utilizado o aumento na frequência de mitoses nas células de defesa através de uma suspensão de levedura (CAVALLINI & BERTOLLO, 1988).

Injetou-se intraperitonealmente suspensão de levedura (0,5 gramas de fermento de padaria + 1,5 gramas de dextrose + 6 mL de  $H_2O$ ) na proporção de 1 mL/ 100 gramas de peso animal durante 48 horas, após esse tempo o material foi processado para a preparação de cromossomos mitóticos.

#### **3.1.1. Tratamento “*in vivo*”**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica descrita por Bertollo et al. (2015):

Foi injetado em cada espécime, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso. Posteriormente, os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 40 minutos. Decorrido esse tempo, os espécimes foram anestesiados com óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000) e sacrificados, e porções do rim foram retiradas. O material foi lavado em solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl 0,075M), sendo transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10mL desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de

dissecação, sendo completado este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, esta suspensão foi incubada a 36°C/20 min. O material foi ressuspendido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador (metanol:ácido acético - 3:1) foram acrescentadas ao material, que foi homogeneizado e centrifugado a 800rpm/10min, descartando-se o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Foram adicionados, vagarosamente, 5-7mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1mL de fixador, misturando bem o material. Posteriormente o material (suspensão celular) foi acondicionado microtubos tipo Ependorff e guardado no refrigerador.

### **3.1.3. Preparo de lâminas – Coloração convencional por Giemsa**

Sobre uma lâmina limpa pingou-se 1-3 gotas de suspensão celular, deixando-a secar ao ar. Em seguida corou-se a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), pH = 6,8, por 7 minutos.

### **3.1.4. Determinação da heterocromatina – bandamento C**

Para a determinação de heterocromatina foi adotado o procedimento básico de bandamento C descrito por Sumner (1972). Primeiramente a lâmina foi tratada em solução de ácido clorídrico (HCl 0,2N) a 42°/8min. A lâmina foi lavada em água corrente e seca ao ar. Em seguida, a lâmina foi colocada em solução aquosa de hidróxido de bário ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$

5%) a 42°C/2 min e em seguida foi mergulhada três vezes em HCl 0,2N e lavada em água corrente, secando ao ar. Em seguida, colocou-se a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°/35 minutos. Por último, lavou-se a lâmina em água corrente, deixando secar ao ar e corando com 0,7 µL iodeto de propídeo (50 µg/mL) e 20 µL de anti-fading (LUI et al. 2012).

### **3.1.5. Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo - impregnação por nitrato de prata (Ag-RONs)**

A técnica de impregnação pelo nitrato de prata, segundo o procedimento descrito por Howell & Black (1980), foi utilizada para a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs). A prata se associa com as proteínas nucleolares, e marca somente as RONs ativas na intérfase precedente. Colocou-se sobre uma lâmina previamente preparada 3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 grama de gelatina incolor + 50mL de H<sub>2</sub>O + 0,5mL de ácido fórmico) e adicionou-se sobre cada gota duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Em seguida, cobriu com uma lamínula e colocou em estufa a 60°C/8 min. Após isso a lamínula escorreu debaixo de água corrente e secou ao ar. A lâmina foi observada ao microscópio.

### **3.1.6. Estudos cariotípicos**

As preparações foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão. Com a utilização de uma câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50, as imagens selecionadas foram capturadas através do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Após a captura, os homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico), seguindo a classificação proposta por Levan et al. (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

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 dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos com um braço.

## **3.2. Metodologia Molecular**

### **3.2.1. Extração de DNA total com fenol:clorofórmio**

A extração de DNA total foi realizada segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001). Inicialmente, pequenos pedaços de tecido foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 700 $\mu$ L de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris-HCl 0,01M; Proteinase K – 100 $\mu$ g/mL e SDS 0,1%). As amostras foram então incubadas a 55°C/2h. Foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o material foi agitado suavemente por 20 minutos. Centrifugou-se o material a 13.000rpm/15min e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. Foram acrescentados 1 volume de NaCl 1M e 2 volumes de etanol 100% gelado. O material foi agitado suavemente, posteriormente centrifugado a 10.000rpm/10min e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 200 $\mu$ L de álcool 70% gelado e centrifugou-se o material a

10.000rpm/5min. O sobrenadante foi descartado. Secou-se o DNA em estufa a 37°C e este foi resuspendido em tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM). Acrescentou-se 1µL de RNase (concentração final = 100µg/mL).

Após a extração do DNA total, foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras.

### 3.2.2. Obtenção e marcação das sondas

As sondas utilizadas para o mapeamento físico dos cromossomos foram pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As sequências As51, snRNA U2, H3, H4, Rex1, Rex3 foram amplificadas a partir do genoma de *Astyanax aff. scabripinnis*. A sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> e (GATA)<sub>n</sub> foram amplificadas na ausência de DNA molde. Os *primers* utilizados para a amplificação dos DNAs repetitivos encontram-se descritos na tabela 3. Os DNAs ribossômicos 18S e 5S foram amplificados a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e Martins & Galetti Jr. (2001), respectivamente.

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, de acordo com instruções do fabricante (Roche Applied Science). Foram utilizados os compostos biotina 16-dUTP para as sondas de DNAr 18S, As51, snRNA U2, H3 e Rex3, já para as outras sondas: DNAr 5S, H4, Rex 1, telomérica e (GATA)<sub>n</sub> foi utilizado o composto digoxigenina 11-dUTP.

Os três oligonucleotídeos enriquecidos com microssatélites: (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub> e (GAG)<sub>10</sub>, foram obtidos comercialmente junto a Sigma, com marcação direta Cy3 na extremidade 5' durante a síntese.

**Tabela 3:** Sequências de DNAs repetitivos amplificadas e seus respectivos *primers*.

<b>Sequência</b>	<b>Primers utilizados</b>	<b>Referência</b>
As51	As51-F 5'GGTCAAAAAGTCGAAAAA -3' As51-R 5'GTACCAATGGTAGACCAA -3'	Mestriner et al. 2000
snRNA U2	U2F 5' - ATCGCTTCTCGGCCTTATG -3' U2R 5' - TCCCGGCGGTACTGCAATA -3'	Cross et al. 2005
H3	5' - ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC -3' 5' - ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC -3'	Colgan et al. 1998
H4	H4 F2s 5' - TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC -3' H4 F2er 5' - CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT -3'	Pineau et al. 2005
Rex1	Rex1f 5' - TTCTCCAGTGCCTTCAACACC -3' Rex1r 5' - TCCCTCAGC AGAAAGAGTCTGCTC -3'	Volff et al. 1999
Rex3	Rex3f 5' - CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG -3' Rex3r 5' - TGGCAGACNGGGGTGGTGGT -3'	Volff et al. 2000
Telomérica	(TTAGGG) <sub>5</sub> (CCCTAA) <sub>5</sub>	Ijdo et al. 1991
(GATA) <sub>n</sub>	(GATA) <sub>7</sub> (TATC) <sub>7</sub>	Epplen et al. 1982

### 3.2.3. Hibridização *in situ* Fluorescente - FISH (PINKEL et al. 1986)

Hibridizações *in situ* Fluorescente (FISH) foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações. Foi realizada Dupla hibridização (Double-FISH) com as seguintes sondas: DNAr 18S e DNAr 5S, snRNA U2 e DNAr 5S, histonas H3 e H4, retroelemento Rex1 e Rex3. Para a sequência As51, telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> e sequência de microsatélite de repetições (GATA)<sub>n</sub> foi realizada simples hibridização *in situ* Fluorescente.

### 3.2.4. Simples Hibridização *in situ* Fluorescente

#### Preparação das lâminas:

As lâminas foram incubadas com 100µL solução de RNase (0,4% RNase/2xSSC) em câmara úmida a 37°C/1h e em seguida lavadas 3 vezes em solução de 2xSSC, sendo 5 minutos cada lavagem. Todas as lavagens do processo foram realizadas sob agitação. Então, foram incubadas em solução de pepsina (pepsina 0,005%/HCl 10mM) por 10 minutos e

lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas em solução de formaldeído 1% por 10 minutos e lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Fez-se a desidratação em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada. Após, foi realizada a desnaturação do DNA cromossômico em formamida (formamida 70%/2xSSC) a 70°C/4 min, sendo as lâminas desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada.

### **Hibridização:**

O mix de hibridização consistiu de: 6µL de sonda, 6µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 30µL de formamida, 12µL de sulfato de dextrano 50% e 6µL de 20xSSC, por lâmina. Em seguida a solução de hibridização foi colocada em banho-seco a 100 °C/10min, sendo retirada e colocada imediatamente no gelo. Para a hibridização, foram colocados 60µL da solução em cada lâmina e essas foram incubadas em câmara úmida a 37°C/16h.

### **Detecção do sinal:**

As lâminas foram lavadas com solução de formamida (formamida 15 %/0,2xSSC) a 42°C/20min e em seguida lavadas em solução Tween (Tween 0,05 %/4 x SSC), por 5 minutos. Posteriormente, foram incubadas em tampão NFDM (NFDM 5%/4xSSC) por 15 minutos em temperatura ambiente e, então, lavadas duas vezes com solução Tween, 5 minutos cada. As sondas marcadas com digoxigenina (telomérica e GATA<sub>n</sub>) foram detectadas com rodamina e a sonda marcada com biotina (As51) foi detectada com FITC. Para a detecção do sinal, foram colocados sobre cada lâmina 100µL do mix de detecção, contendo: 99,5µL de NFDM e 0,5µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, para marcação com digoxigenina e 99µL de NFDM e 1µL de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidin) conjugada para marcação com biotina, permanecendo incubadas em câmara úmida a 37°C/60min e então lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Foi

realizada amplificação do sinal de FITC somente para sonda de As51 FITC, sendo colocados sobre cada lâmina 100µL do mix de amplificação, composto por: 99µL de NFDM e 1µL anti-avidina biotina, sendo então imbuídas em câmara úmida a 37°C/30min e então lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Novamente fez a detecção do sinal de FITC, sendo colocado 100 µL do mix de detecção contendo: 99µL de NFDM e 1µL avidina-FITC conjugada e então incubadas novamente em câmara úmida a 37°C/30min e posteriormente lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Em seguida realizou-se a desidratação em série alcoólica com etanol 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho.

#### **Montagem das lâminas:**

Os cromossomos serão forados contra corados com solução contendo 25µL de antifading e 0,1µL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2mg/mL), na lâmina. A lâmina foi coberta com lamínula e guardada em local protegido da luz.

### **3.2.5. Dupla Hibridização *in situ* Fluorescente**

#### **Preparação das lâminas:**

As lâminas foram incubadas com 100µL solução de RNase (0,4% RNase/2xSSC) em câmara úmida a 37°C/1h e em seguida lavadas 3 vezes em solução de 2xSSC, sendo 5 minutos cada lavagem. Todas as lavagens do processo foram realizadas sob agitação. Então, foram incubadas em solução de pepsina (pepsina 0,005%/HCl 10mM) por 10 minutos e lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas em solução de formaldeído 1% por 10 minutos e lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Fez-se a desidratação em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada. Após, foi realizada a desnaturação do DNA cromossômico em formamida (formamida 70%/2xSSC) a

70°C/4 min, sendo as lâminas desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada.

### **Hibridização:**

O mix de hibridização consistiu de: 6µL de sonda 1, 6µL de sonda 2, 30µL de formamida, 12µL de sulfato de dextrano 50% e 6µL de 20xSSC, por lâmina. Em seguida a solução de hibridização foi colocada em banho-seco a 100 °C/10min, sendo retirada e colocada imediatamente no gelo. Para a hibridização, foram colocados 60µL da solução em cada lâmina e essas foram incubadas em câmara úmida a 37°C/16h.

### **Detecção e amplificação do sinal:**

As lâminas foram lavadas com solução de formamida (formamida 15 %/0,2xSSC) a 42°C/20min e em seguida lavadas em solução Tween (Tween 0,05 %/4 x SSC), por 5 minutos. Posteriormente, foram incubadas em tampão NFDM (NFDM 5%/4xSSC) por 15 minutos em temperatura ambiente e, então, lavadas duas vezes com solução Tween, 5 minutos cada. As sondas marcadas com biotina foram detectadas com FITC e as marcadas com digoxigenina foram detectadas com rodamina. Para a detecção dos sinais, foram colocados sobre cada lâmina 100µL do mix de detecção, contendo: 98,5µL de NFDM, 1µL de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidin) conjugada e 0,5µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo incubadas em câmara úmida a 37°C/60min e então lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Para a amplificação do sinal de FITC, foram colocados sobre cada lâmina 100µL do mix de amplificação, composto por: 99µL de NFDM e 1µL anti-avidina biotina, sendo então imbuídas em câmara úmida a 37°C/30min e então lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Novamente fez a detecção do sinal de FITC, sendo colocado 100 µL do mix de detecção contendo: 99µL de NFDM e 1µL avidina-FITC conjugada e então incubadas novamente

em câmara úmida a 37°C/30min e posteriormente lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Em seguida realizou-se a desidratação em série alcohólica com etanol 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho.

#### **Montagem das lâminas:**

Os cromossomos serão contra corados com solução contendo 25µL de antifading e 0,1µL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2mg/mL), po lâmina. A lâmina foi coberta com lamínula e guardada em local protegido da luz.

#### **3.2.6. Simple Hibridização *in situ* Fluorescente (KUBAT et al. 2008)**

A simples hibridização *in situ* fluorescente, segundo o protocolo de Kubat et al. 2008, foi utilizada para realizar as hibridizações com as sondas dos microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub> e (GAG)<sub>10</sub>.

#### **Preparação das lâminas**

As lâminas foram incubadas em solução de RNase (0,4% RNase/2xSSC) em câmara úmida a 37°C/1h e em seguida lavadas 1 vez em tampão 1xPBS por 5 minutos. Todas as lavagens do processo foram realizadas sob agitação. Então, foram incubadas em solução de pepsina (pepsina 0,005%/HCl 10mM) por 10 minutos e lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas em solução de formaldeído 1% por 10 minutos e lavadas em tampão 1xPBS por 5 minutos. Fez-se a desidratação em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 2 minutos cada. Após, foi realizada a desnaturação do DNA cromossômico em formamida (formamida 70%/2xSSC) a 72°C/3 min, sendo as lâminas desidratadas em série alcoólica de etanol 50%, 75% e 100%, por 2 minutos cada.

#### **Hibridização:**

O mix de hibridização consistiu de: 2 $\mu$ L de sonda, 12,5 $\mu$ L de formamida, 5 $\mu$ L de sulfato de dextrano 50% e 2,5 $\mu$ L de 20xSSC, por lâmina. Em seguida a solução de hibridização foi colocada em banho-seco a 85°C/10min e em seguida mantidas a 4°C/2min. Para a hibridização, foram colocados 20 $\mu$ L da solução em cada lâmina e essas foram incubadas em câmara úmida a 37°C/16h.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 2xSSC e 1xSSC por 5 minutos cada banho. As lâminas foram então desidratadas em série alcoólica de etanol 50%, 70% e 100% por 2 minutos cada.

#### **Montagem das lâminas:**

Os cromossomos serão foram contra corados com solução contendo 20 $\mu$ L de antifading e 0,1 $\mu$ L 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2mg/mL), po lâmina. A lâmina foi coberta com lamínula e guardada em local protegido da luz.

#### **3.2.7. Análise dos resultados**

As preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic), com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50.



# *RESULTADOS*

#### 4. RESULTADOS

Todos os exemplares das espécies analisadas apresentaram  $2n=50$  cromossomos, com variações intra e interespecíficas evidenciadas nas fórmulas cariotípicas e número fundamental (NF) (Tab. 4). Os indivíduos de *Astyanax* cf. *goyanensis*, provenientes do ribeirão das Brancas, apresentaram dois cariótipos distintos e foram classificados em cariomorfo A ( $4♀$  e  $1♂$ ) e cariomorfo B ( $6♀$  e  $2♂$ ). Não foi observada a ocorrência de cromossomos Bs e de cromossomos sexuais diferenciados nas espécies estudadas, além da ausência de híbridos interespecíficos.

**Tabela 4:** Número diplóide ( $2n$ ), fórmulas cariotípicas e número fundamental (NF) das espécies analisadas.

Espécie	Localidade/Bacia	$2n$	Fórmula Cariotípica	NF	Figura
<i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i>	Ribeirão dos Negros/Alto rio Paraná	50	$6m+26sm+2st+16a$	84	2a
<i>Astyanax</i> cf. <i>intermedius</i>	Ribeirão Grande/Paraíba do Sul	50	$4m+10sm+36a$	64	2c
<i>Astyanax</i> cf. <i>goyanensis</i> (cariomorfo A)	Ribeirão das Brancas/Tocantins	50	$6m+26sm+18a$	82	2e
<i>Astyanax</i> cf. <i>goyanensis</i> (cariomorfo B)	Ribeirão das Brancas/Tocantins	50	$4m+32sm+14a$	86	2g

\* $2n$  Número diplóide; **NF** Número Fundamental; **m** metacêntrico; **sm** submetacêntrico; **st** subteloalocêntrico; **a** acrocêntrico

A distribuição da heterocromatina, verificada pelo bandamento C, evidenciou padrão comum de marcas pálidas em posição centromérica na maioria dos cromossomos das populações, além de algumas bandas terminais (Fig. 2b, 2d, 2f, 2h). Entretanto, o cariomorfo A de *Astyanax* cf. *goyanensis* foi o único que apresentou blocos de heterocromatina proeminentes na região terminal da maioria dos cromossomos acrocêntricos (Fig. 2f).

A impregnação por nitrato de prata evidenciou Regiões Organizadoras de Núcléolo (AgRON) múltiplas e simples. Para *Astyanax aff. scabripinnis* esses sítios foram localizados na posição terminal do braço curto (p) e braço longo (q) dos pares submetacêntrico 5 e acrocêntrico 19, respectivamente (Em caixa, Fig. 2b). Para *Astyanax cf. intermedius* esses sítios foram localizados em posição terminal do braço p nos pares acrocêntricos 22, 23 e 25 (Em caixa, Fig. 2d). Ambos os cariomorfos de *Astyanax cf. goyanensis* apresentaram AgRON simples, em posição terminal no braço p do par acrocêntrico 21 (Em caixa, Fig. 2f, 2h).

O mapeamento físico cromossômico pela FISH com diferentes sondas de DNA repetitivos mostrou diversidade no que se refere à composição genômica das espécies estudadas. Para as sondas de DNAr 5S e DNAr 18S, diferentes pares cromossômicos apresentaram-se portadores desses cístrons. *Astyanax cf. intermedius* foi a espécie que apresentou o maior número de sítios de DNAr, com até 12 sítios de DNAr 18S, além de um par com marcação bitelomérica (par acrocêntrico 11), e 14 sítios de DNAr 5S. Além disso, houve ocorrência de sítios sintênicos em todas as populações, exceto no cariomorfo A de *Astyanax cf. goyanensis* (Fig. 3; Tab. 5).

**Tabela 5:** Resultados da FISH com sondas de DNAr 18S e DNAr5S para as populações analisadas.

<b>Espécie</b>	<b>Pares cromossômicos portadores de DNAr 5S</b>	<b>Pares cromossômicos portadores de DNAr 18S</b>	<b>Pares sintênicos</b>
<i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i>	2, 19	18, 19, 21, 22, 24 e um cromossomo do par 20	19
<i>Astyanax</i> cf. <i>intermedius</i>	12, 15, 16, 17, 22, 23 e um cromossomo dos pares 11 e 21	10, 11, 14, 22, 23, 25	22, 23 e um cromossomo do par 11
<i>Astyanax</i> cf. <i>goyanensis</i> (cariomorfo A)	2, 5	21	-
<i>Astyanax</i> cf. <i>goyanensis</i> (cariomorfo B)	2, 5	21 e um cromossomo do par 5	Um cromossomo do par 5

No presente trabalho, sequências do elemento repetitivo As51 foram restritas a cromossomos acrocêntricos, com variação na localização do sítio (Fig. 4). Para *Astyanax* aff. *scabripinnis* os sítios foram localizados na porção terminal do braço q nos pares 19, 24 e um cromossomo do par 20, e em posição terminal do braço p no par 21 (Fig. 4a). Para o cariomorfo A de *Astyanax* cf. *goyanensis*, os sítios se localizaram em posição terminal do braço p nos pares 17, 18, 19 e 22 e em posição terminal do braço q em um cromossomo do par 17 (Fig. 4b). Já para o cariomorfo B os sítios encontraram-se alocados em posição terminal do braço q no par 20 e em posição terminal do braço p nos pares 21 e 22 (Fig. 4c). Não houve sinal de hibridização para a *Astyanax* cf. *intermedius*.

Em relação à sonda de snRNA U2 houve variação da localização cromossômica dos sítios entre as espécies (Fig. 5). Para *Astyanax* aff. *scabripinnis* os sítios encontraram-se alocados na região distal do braço p dos pares submetacêntricos 5 e 15 (Fig. 5a), enquanto para *Astyanax* cf. *intermedius* esses sítios localizaram-se na região terminal do braço p nos pares acrocêntricos 9, 13, 16 e 22 (Fig. 5b). Para o cariomorfo A de *Astyanax* cf. *goyanensis*, os sítios estavam na região distal do braço p nos pares submetacêntricos 6 e 13 (Fig. 5c), já no cariomorfo B estava presente também na região distal do braço p do par

submetacêntrico 16 e em um cromossomo do par submetacêntrico 10, na região distal do braço q (Fig. 5d). Somente para *Astyanax cf. intermedius* foi observada sintenia em dois pares (16 e 22) entre DNAr5S e snRNA U2 (Em caixa, Fig. 5e).

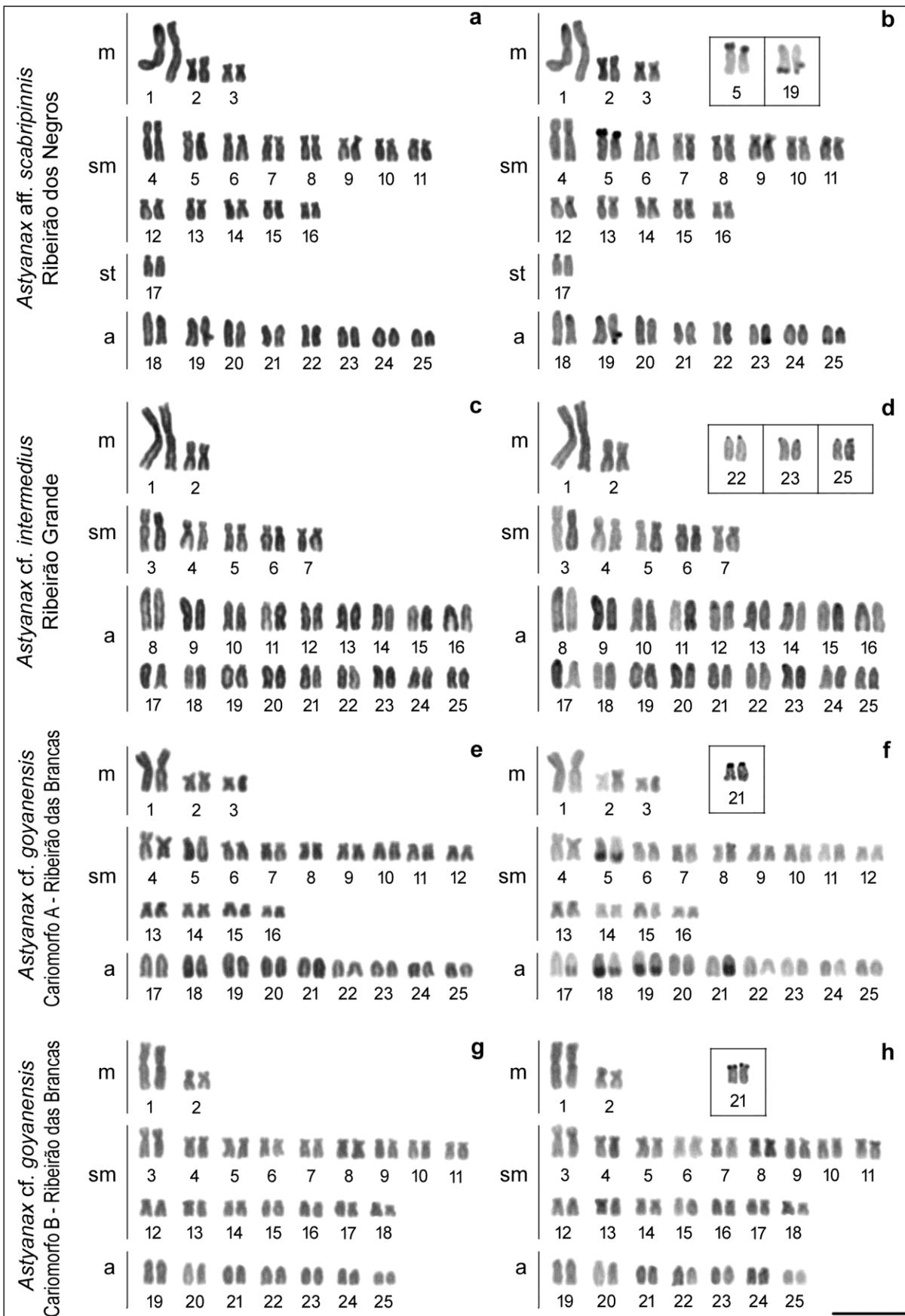
Para as sondas de Histonas H3 e H4 a FISH evidenciou a ocorrência de sintenia em todas as populações (Fig. 6). Para *Astyanax aff. scabripinnis* os cístrons de H3 e H4 encontraram-se alocados na região distal do braço p dos pares submetacêntricos 5 e 12, além da H3 mostrar-se disperso pelos outros cromossomos (Fig. 6a). Para *Astyanax cf. intermedius* a sintenia se deu na região terminal do par acrocêntrico 23, com H3 fracamente também disperso (Fig. 6b). Já para o cariomorfo A de *Astyanax cf. goyanensis*, observou-se tanto H3 quanto H4 dispersos, mas com sítio sintênico em destaque na região terminal do braço p do par acrocêntrico 21 (Fig. 6c), enquanto no cariomorfo B somente H3 mostrou-se disperso, com sítios sintênicos na região distal do braço p do par submetacêntrico 4 e na região terminal do braço p do par acrocêntrico 21 (Fig. 6d).

Em relação às sondas de Rex1 e Rex3, não houve acúmulo preferencial em nenhuma região cromossômica e ambas se mostraram dispersas pelos cromossomos nas três espécies. Não houve sinal de hibridização de Rex1 em *Astyanax cf. intermedius* (Fig. 7).

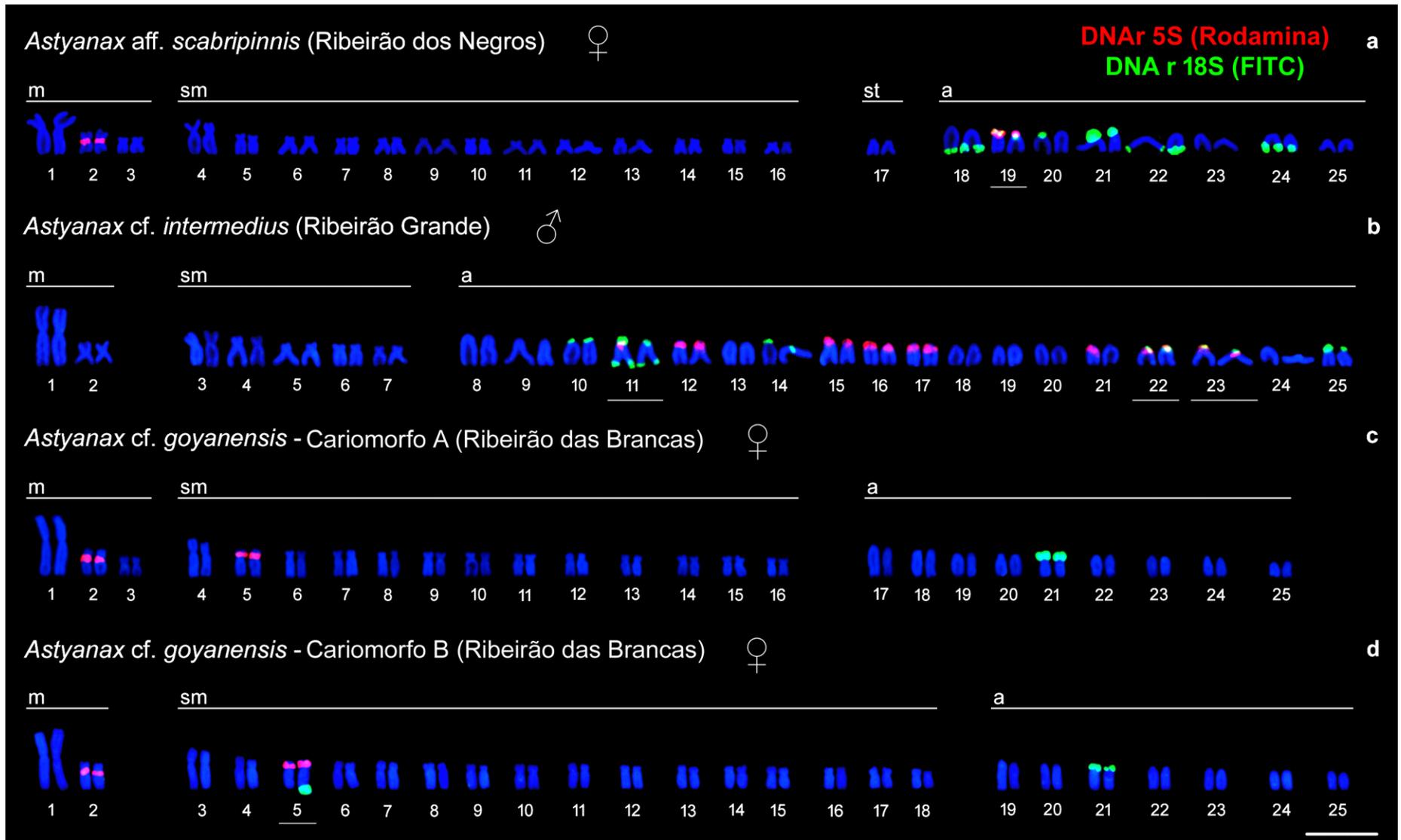
Para a sonda de sequência telomérica, os sítios encontraram-se restritos a porção terminal dos cromossomos em todas as espécies, sem a ocorrência de ITS (Interstitial Telomeric Site) (Fig. 8).

Por fim, os microssatélites apresentaram as seguintes distribuições nos cromossomos (Fig. 9): 1) *Astyanax aff. scabripinnis*: (GA)<sub>15</sub>: presente em maior concentração na região terminal e pericentromérica; (GAG)<sub>10</sub>: disperso, com pouco acúmulo na região terminal de alguns cromossomos; e (GATA)<sub>n</sub>: disperso, com blocos

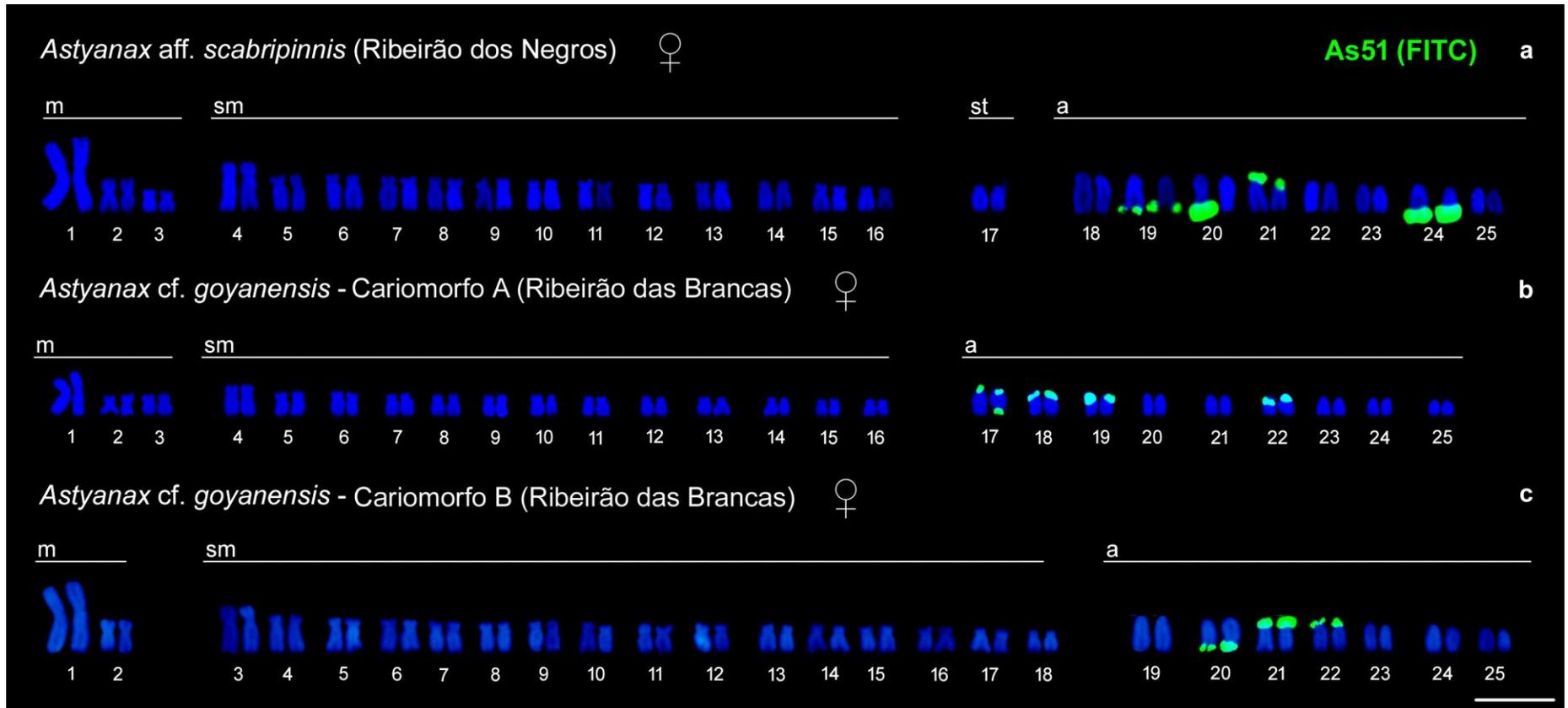
terminais mais fortes, sendo um bloco mais proeminente em um par de cromossomos acrocêntricos; 2) *Astyanax cf. intermedius*: (GA)<sub>15</sub>: blocos terminais e algumas marcações centroméricas; (GAG)<sub>10</sub>: disperso, com acúmulo preferencial na porção terminal de alguns cromossomos; e (GATA)<sub>n</sub>: blocos teloméricos em alguns cromossomos acrocêntricos; 3) *Astyanax cf. goyanensis*: (GA)<sub>15</sub>: disperso, com algum acúmulo preferencial na porção terminal dos cromossomos, além de acúmulo no centrômero de alguns cromossomos, em ambos cariomorfos, (GATA)<sub>n</sub>: disperso, com bloco terminal no braço p de um par de acrocêntricos, para o cariomorfo A e disperso com bloco centromérico em um par submetacêntrico, para o cariomorfo B, (GAG)<sub>10</sub>: não houve sinais de hibridização nos cromossomos de ambos cariomorfos. Já para o microsatélite (CA)<sub>15</sub> observou-se o mesmo padrão nas três espécies, sendo disperso, com maior concentração na região terminal e pericentromérica dos cromossomos.



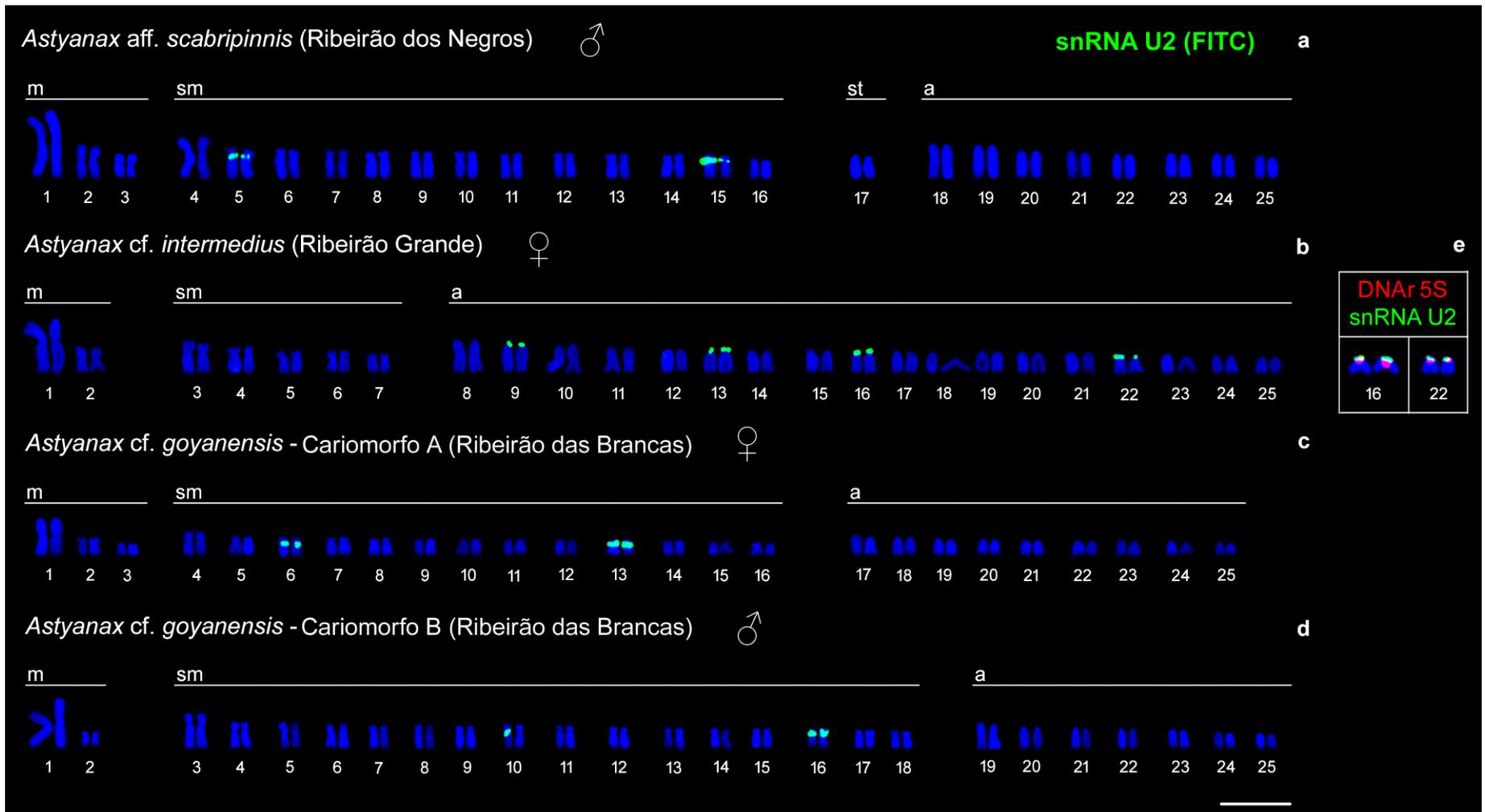
**Figura 2:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a, b), *Astyanax* cf. *intermedius* (c, d), *Astyanax* cf. *goyanensis* (e, f, g, h). Cariótipos corados com Giemsa (a, c, e, g) e posteriormente C bandados (b, d, f, h). Em caixa são apresentados os pares cromossômicos portadores de AgRONS para cada população. Barra=10µm.



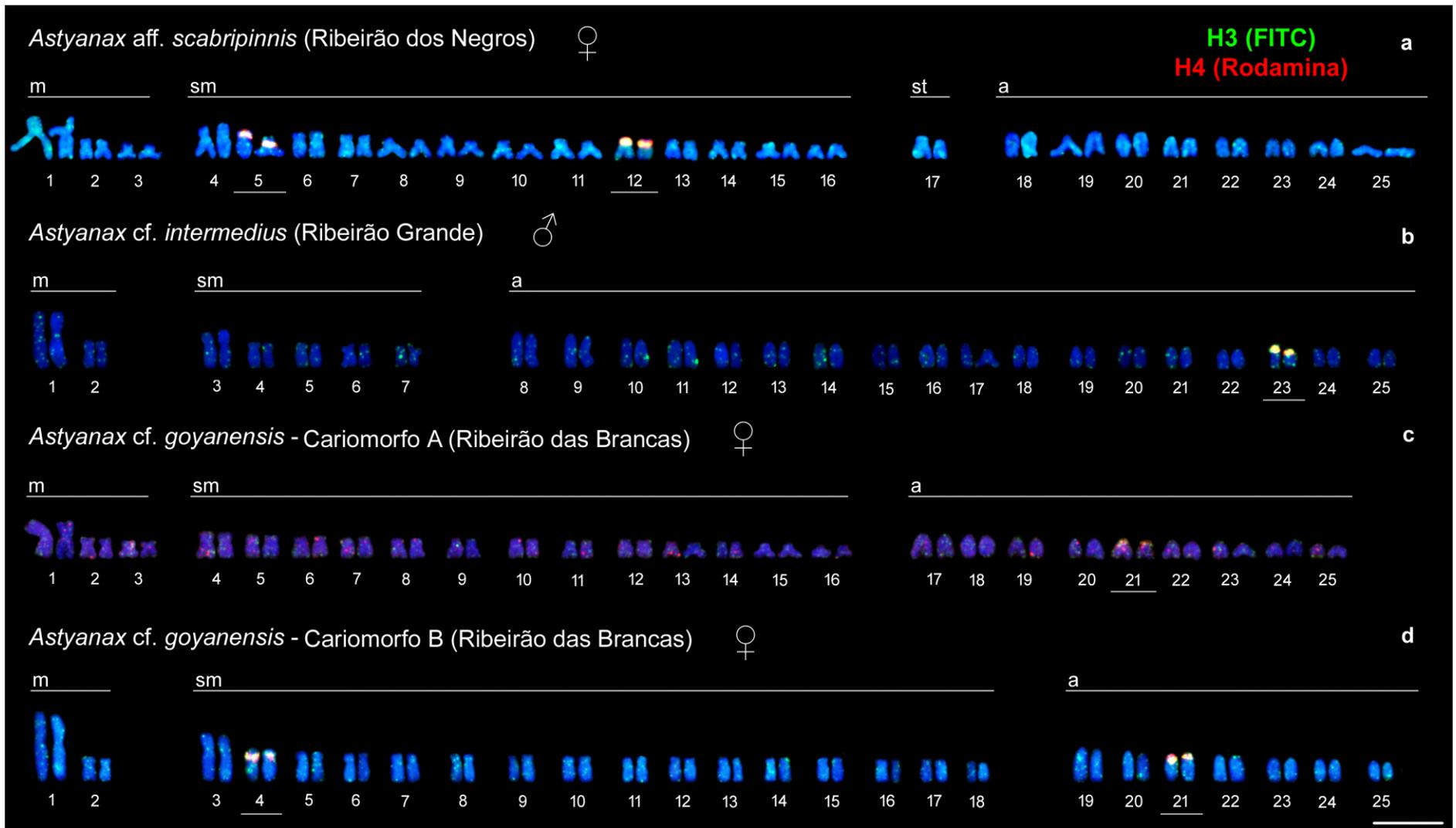
**Figura 3:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) e DNAr 18S (FITC – sinal verde). Em destaque (linhas) cromossomos portadores de sintenia 5S/18S. Barra=10µm.



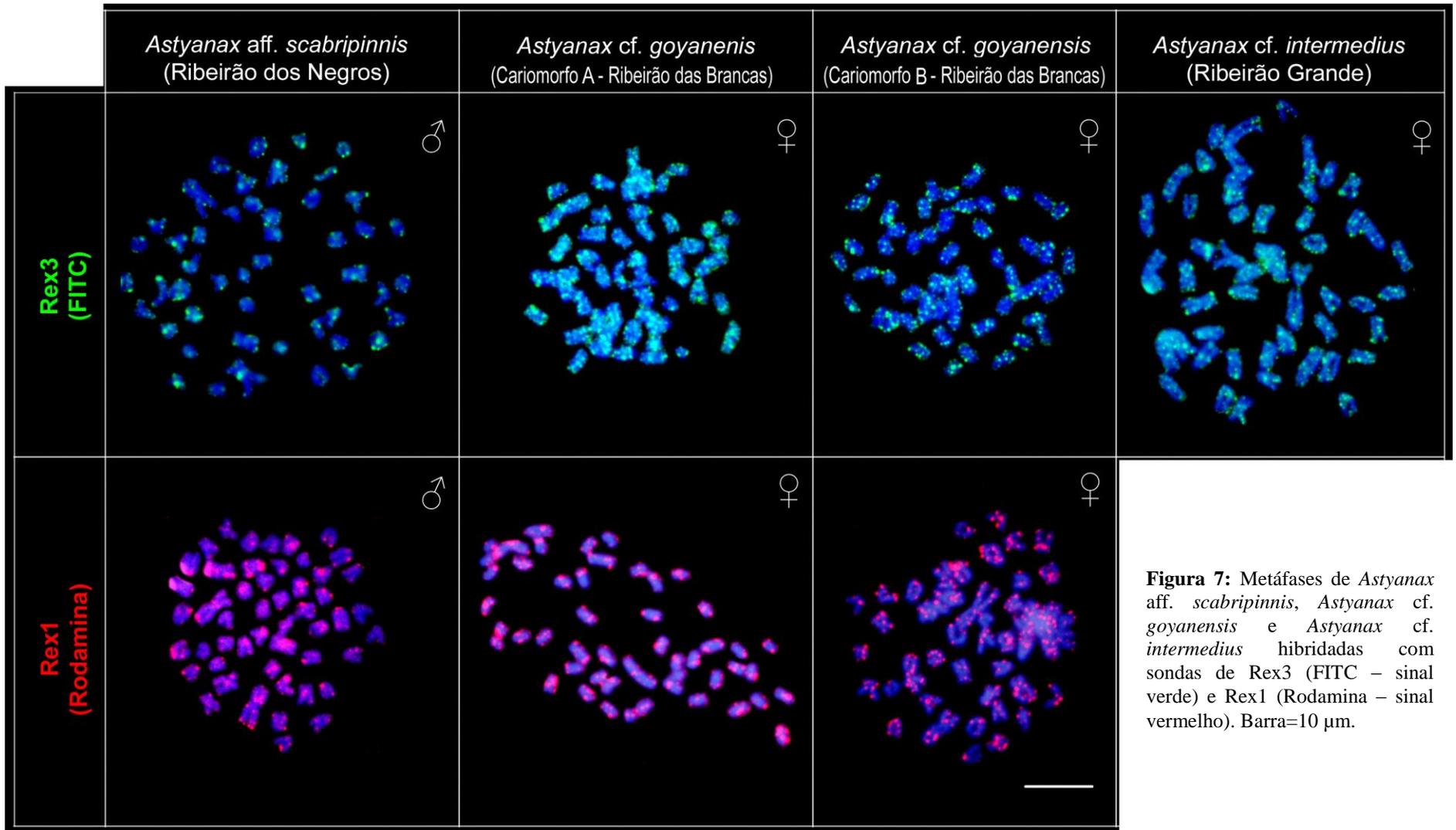
**Figura 4:** Cariótipos de *Astyanax aff. scabripinnis* (a), *Astyanax cf. goyanensis* (b, c) hibridados com sonda de As51(FITC – sinal verde). Barra=10µm.



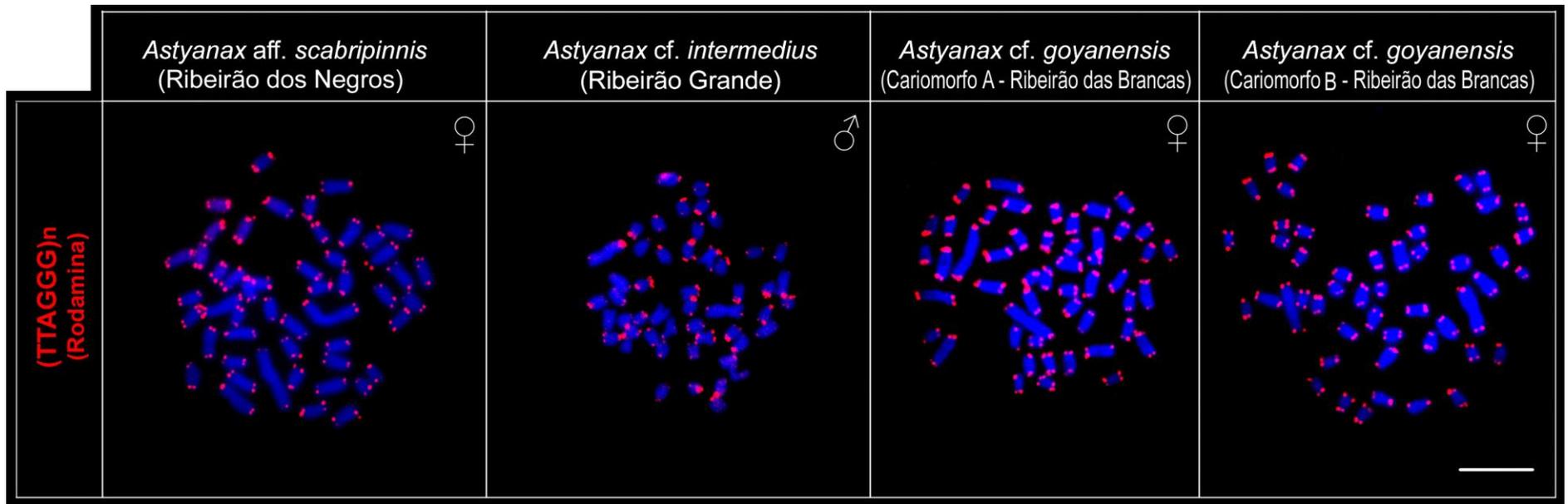
**Figura 5:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de snRNA U2 (FITC – sinal verde). Em caixa, ocorrência de sintenia DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) e snRNA U2 (FITC – sinal verde) em *Astyanax* cf. *intermedius*. Barra=10 µm.



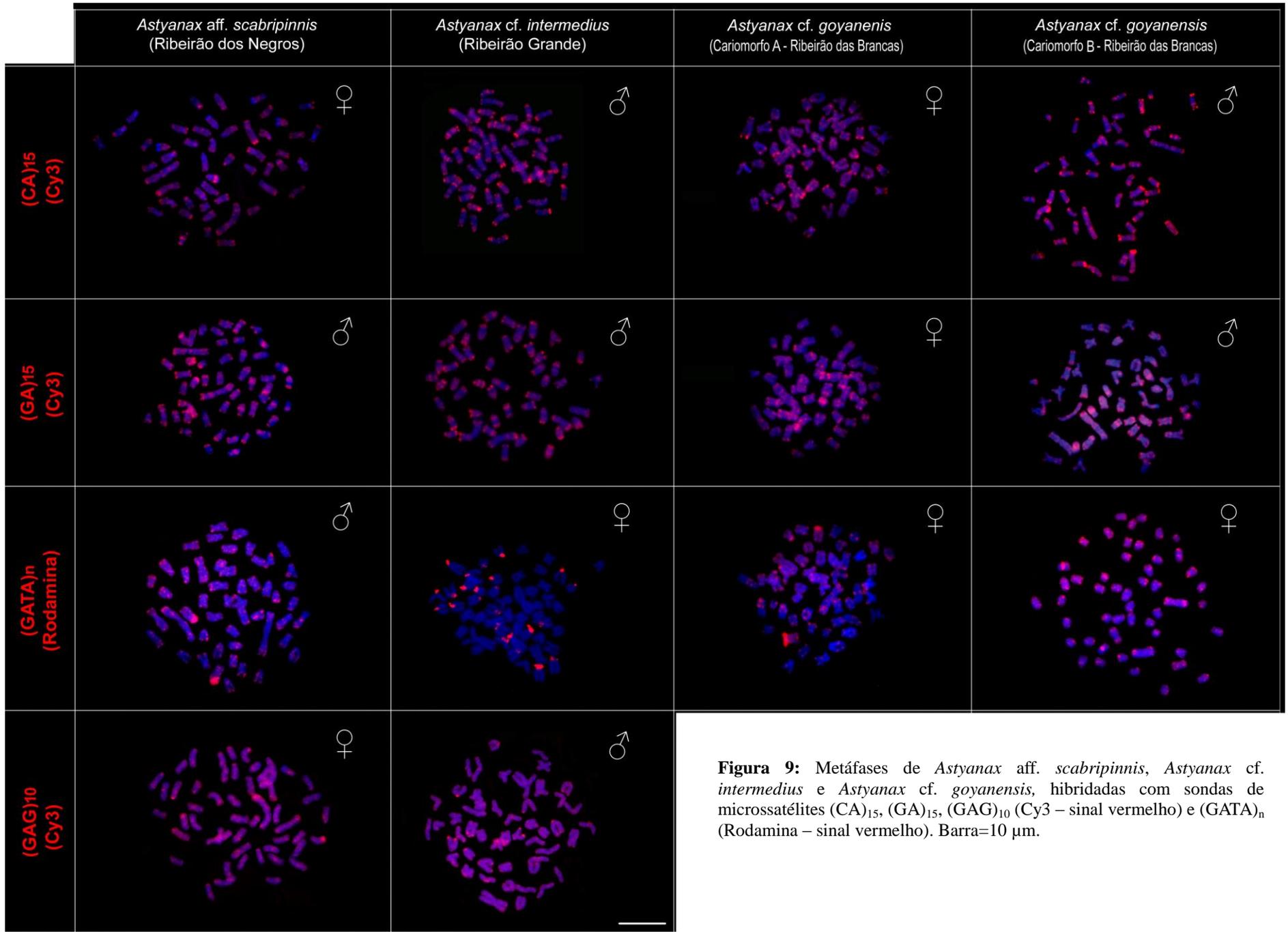
**Figura 6:** Cariótipos de *Astyanax* aff. *scabripinnis* (a), *Astyanax* cf. *intermedius* (b), *Astyanax* cf. *goyanensis* (c, d) hibridados com sondas de histonas H3 (FITC – sinal verde) e H4 (Rodamina – sinal vermelho). Em destaque (linhas) cromossomos portadores de sintenia H3/H4. Barra=10 µm.



**Figura 7:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *goyanensis* e *Astyanax* cf. *intermedius* hibridadas com sondas de Rex3 (FITC – sinal verde) e Rex1 (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10 µm.



**Figura 8:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *intermedius* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, hibridadas com sonda de sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10 μm.



**Figura 9:** Metáfases de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *intermedius* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, hibridadas com sondas de microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (GAG)<sub>10</sub> (Cy3 – sinal vermelho) e (GATA)<sub>n</sub> (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10 µm.



# *DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

Com aproximadamente 140 espécies válidas, *Astyanax* é considerado o gênero mais rico em espécies de Characiformes (NELSON, 2016), sendo classificado atualmente como *incertae sedis* devido à ausência de dados que suportem seu monofiletismo (LIMA et al. 2003; TÉRAN et al. 2020). As espécies desse gênero apresentam número diploide variando de  $2n=36$ , como em *Astyanax schubarti* (DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001) e *Astyanax correntinus* (PAIZ et al. 2015), até  $2n=50$ , que pode ser observado na maioria das espécies do gênero, sendo assim o mais frequente (PAZZA & KAVALCO, 2007). *Astyanax* é um grupo composto por muitas espécies crípticas, as quais são morfológicamente muito semelhantes, mas apresentam grande variabilidade cariotípica, sendo assim considerada a existência de vários complexos de espécies dentro do gênero, como *A. bimaculatus*, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*.

O termo complexo de espécies *A. scabripinnis* foi assim nominado primeiramente por Moreira-Filho & Bertollo (1991), a partir da análise de diferentes populações de *A. scabripinnis* para as quais encontraram grande diversidade no que se refere ao número diplóide, estrutura cariotípica, distribuição de heterocromatina, além de caracteres morfológicos. Muitos estudos realizados posteriormente corroboraram com essa proposta, demonstrando a variabilidade cariotípica encontrada no grupo, com número diploide variando de  $2n=46$ , 48 e 50 cromossomos, sendo  $2n=50$  o mais frequentemente encontrado (Tab. 6). Essa variação observada no número diploide é proveniente da ocorrência de rearranjos cromossômicos como fusão/fissão ou translocações. Além disso, a grande variabilidade cariotípica encontrada, com diferentes fórmulas cariotípicas, assim como observada nas espécies desse estudo, pode ser decorrente de inversões pericentricas, e apesar de serem espécies muito similares morfológicamente, a estrutura cariotípica

encontrada em cada uma delas, muitas vezes é capaz de diferenciá-las entre si, mostrando assim, que possivelmente se tratem de unidades evolutivas diferentes. Atualmente, 33 espécies encontram-se alocadas dentro do complexo *A. scabripinnis* (Tab. 1).

Esse é o primeiro trabalho de caracterização citogenética para *Astyanax* cf. *goyanensis*, o qual apresentou dois cariomorfos distintos (A e B) ocorrendo em simpatria e sintopia. Vale ressaltar que a ocorrência de populações simpátricas é um caso recorrente no grupo, podendo essas populações apresentar  $2n$  distintos, ou assim como no presente estudo,  $2n$  iguais, mas diferenças nas fórmulas cariotípicas, além de outros caracteres citogenéticos que as diferenciam (Tab. 6).

Espécimes triploides já foram relatados para o complexo (Tab. 6), e, até o momento, não foi relatada a ocorrência de híbridos interespecíficos entre espécies do complexo *A. scabripinnis*. Entretanto, Pinheiro et al. (2019) relataram a ocorrência de híbridos entre *A. paranae* e *A. fasciatus*, assim como Artoni et al. (2006) e Gavazzoni et al. (2020) encontraram híbridos entre dois citótipos de *A. fasciatus*, mostrando assim que eventos de hibridizações entre espécies crípticas podem ocorrer naturalmente.

A ocorrência de cromossomos Bs não foi observada em nenhuma das espécies estudadas no presente trabalho, contudo esta é considerada uma característica marcante dos exemplares pertencentes ao complexo *A. scabripinnis*. Cromossomo B do tipo metacêntrico grande, semelhante ao primeiro par cromossômico, é o mais encontrado, entretanto variações na morfologia, número e padrão heterocromático são bastante comuns (Tab. 6; MOREIRA-FILHO et al. 2004). De acordo com Carvalho et al. (2008), Characiformes é a ordem de peixes onde se encontra a maior riqueza de cromossomos Bs, e mais de 50% das espécies portadoras desses cromossomos, estão alocadas nessa ordem.

O padrão de distribuição de heterocromatina observado no cariomorfo A de *Astyanax cf. goyanensis*, com blocos heterocromáticos em destaque nos cromossomos acrocêntricos, é considerado uma característica comum no grupo (MAISTRO et al. 1992, 1994; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1997; MESTRINER et al. 2000; MANTOVANI et al. 2000; FERRO et al. 2001; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001; FERNADES & MARTINS-SANTOS, 2003, 2005; CRISTINA et al. 2003; SANTOS & MORELLI, 2006; SANTOS et al. 2012a, 2012b; SILVA et al. 2014), entretanto, não é regra e cada população pode ser caracterizada até mesmo por apresentar uma distribuição heterocromática específica (MORERIA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; MAISTRO et al. 1994, 1998, 2000; BIAVITI & MAISTRO, 2007; SANTOS et al. 2012b). No presente estudo, a heterocromatina encontrada nos cromossomos das três espécies (bandas centroméricas/terminais/blocos proeminentes) apresentou-se co-localizada em diferentes cromossomos. Esse padrão equilocal de distribuição heterocromática pode ter se originado devido à localização dos cromossomos no núcleo interfásico (SCHWEIZER & LOIDL, 1987; CREMER & CREMER, 2010), onde cromossomos não homólogos podem realizar trocas heterólogas de sequências heterocromáticas e evidenciar um padrão de localização equilocal em diferentes cromossomos (IÑIGO et al. 1996; ARTONI et al. 1999).

Para o complexo *A. scabripinnis*, casos de AgRONS múltiplas ocorrem com maior frequência em relação aos sítios simples (Tab. 6). Estudos também sugerem que a presença de um sítio de AgRON em posição terminal do braço p em um par subtelocêntrico pode ser um importante marcador para o grupo (MAISTRO et al. 2000), contudo esse sítio não foi observado em nenhuma das espécies analisadas nesse estudo, ou pode se tratar de algum cromossomo homeólogo aqui classificado como acrocêntrico, uma vez que as morfologias

cromossômicas podem ser classificadas no limites estabelecidos, caso a ser resolvido somente com pintura cromossômica.

Assim como ocorreu nas espécies *Astyanax* aff. *scabripinnis* e *Astyanax* cf. *intermedius*, um alto número de sítios de DNAr 18S é frequentemente observado no complexo, podendo, assim, ser considerado altamente polimórfico dentro do grupo. Além disso, alguns autores propõem que esse elevado número de sítios pode ser explicado pelo mesmo modelo de Schweizer & Loidl (1987) citado anteriormente (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; MANTOVANI et al. 2005; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006). Contudo, um aumento no número de sítios de DNAr 18S também pode estar associado a elementos transponíveis (TEs) ou até mesmo a pseudogenes (BARBOSA et al. 2017). Já o padrão observado em *Astyanax* cf. *goyanensis*, com um único sítio de DNAr 18S, não é comumente observado, mas já foi relatado para uma população do Ribeirão Grande que também apresentou sítio simples em um par subtelocêntrico (BARBOSA et al. 2015).

Outras espécies de *Astyanax*, como, *A. fasciatus*, *Astyanax xavante*, *Astyanax altiparane* e *A. correntinus* também apresentam sítios múltiplos de DNAr 18S (FERREIRA-NETO et al 2012; TENÓRIO et al. 2013; SILVA et al. 2015; PAIZ et al. 2015, respectivamente). Vale ressaltar, que esses sítios estão sempre localizados na porção terminal do cromossomo, seja no braço p, q ou em ambos, e essas regiões são geralmente heterocromáticas, fato que também pode facilitar eventos de transposição, fazendo assim com que esses segmentos sejam dispersos pelo genoma, elevando o número de sítios (MARTINS & WASCO, 2004). Casos de sítios simples de DNAr 18S , como ocorreu em *Astyanax* cf. *goyanensis*, são observados com mais frequência em espécies fora do complexo *A. scabripinnis*, como em *Astyanax argyrimarginatus* e *Astyanax elachylepis*

(TENÓRIO et al. 2013), *Astyanax asuncionensis* (SILVA et al. 2015; PAIZ et al. 2015; GAVAZZONI et al. 2018), *Astyanax abramis* (PAIZ et al. 2015; TEIXEIRA et al. 2018; GAVAZZONI et al. 2018), *Astyanax lacustris* (TEIXEIRA et al. 2018), *Astyanax jacuhiensis* (GAVAZZONI et al. 2018) e até mesmo *A. fasciatus* e *A. altiparanae*, que além de sítios múltiplos, pode apresentar sítios simples em alguns casos (PAZZA et al. 2006; GAVAZZONI et al. 2018, respectivamente). Desse modo, pode-se supor que sítios simples de DNAr 18S em posição terminal possa representar um estado ancestral para o caráter não só no complexo *A. scabripinnis*, mas dentro do gênero *Astyanax* como um todo.

Por outro lado, a dinâmica de distribuição de sítios DNAr 5S parece ser mais estável do que a observada para o DNAr 18S. Assim como ocorreu em *Astyanax* aff. *scabripinnis* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, o DNAr 5S é encontrado em menor número de sítios e com localização cromossômica mais estável (MANTOVANI et al. 2005; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006; VICARI et al. 2008; SANTOS et al. 2012b; BARBOSA et al. 2017). Já o padrão observado em *Astyanax* cf. *intermedius*, com até 14 sítios de DNAr 5S não é um caso comum no complexo *A. scabripinnis*, para o qual no máximo 8 sítios já foram relatados (FERRO et al. 2001; CASTRO et al. 2014). Além disso, *Astyanax* cf. *intermedius* foi a única espécie que apresentou somente sítios terminais, fato que, assim como mencionado para rDNA 18S poderia facilitar sua dispersão por diferentes cromossomos. Já as outras espécies apresentaram tanto sítios terminais quanto centroméricos, assim, esses sítios alocados mais internamente nos cromossomos parecem estar mais protegidos de eventos de dispersão, o que pode explicar uma menor quantidade de sítios nessas outras espécies (MARTINS & WASCO, 2004). Outras espécies de *Astyanax*, alocadas em outros complexos, parecem seguir esse mesmo padrão com menor número de sítios e em outras posições que não sejam terminais (HASHIMOTO et al. 2011;

GAVAZZONI et al. 2018). Vale ressaltar que todas as espécies analisadas no presente trabalho, exceto *Astyanax* cf. *intermedius*, apresentaram um sítio centromérico de DNAr5S no segundo par metacêntrico, podendo esse ser um bom cromossomo marcador para espécies do complexo.

Analisando uma população de *A. scabripinnis*, Mestriner et al. (2000) identificaram no genoma da espécie um tipo de DNA satélite 59% rico em AT, com unidades monoméricas de 51pb, o qual denominaram As51. Assim como no presente trabalho, Barbosa et al. (2015) também encontraram sítios de As51 restritos a acrocêntricos em três populações distintas de *Astyanax* aff. *scabripinnis*. Entretanto, outros estudos mostram a ocorrência desse sítio em outros tipos cromossômicos, mas sempre na posição terminal do cromossomo (MANTOVANI et al. 2004; ABEL et al. 2006; KAVALCO et al. 2007; BARBOSA et al. 2015, 2017).

Kavalco et al. (2007) analisaram duas populações provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul (*A. scabripinnis* e *A. intermedius*) e, assim como ocorreu no presente estudo com a espécie dessa bacia, também não encontraram sinais de hibridização de As51 em *A. intermedius*, desse modo, propuseram a ocorrência de dois grupos distintos de *Astyanax* nessa bacia: (1) o primeiro apresenta poucos cromossomos acrocêntricos e As51 positivo e (2) o segundo grupo, compatível com a população desse estudo, apresenta muitos cromossomos acrocêntricos e As51 negativo. Ausência da sequência As51 não ocorre somente em *A. intermedius*, uma vez que para uma população de *A. scabripinnis* da bacia do rio São Francisco, essa sequência também não foi encontrada (ABEL et al. 2006). Além disso, fora do grupo *A. scabripinnis*, Kavalco et al. (2008) também não encontraram essa sequência no genoma de *Astyanax bockmanni*. Neste contexto, pode-se dizer que o elemento repetitivo As51, embora não seja uma sinapomorfia de *Astyanax*, representa uma

característica surgida antes mesmo da origem dos cromossomos B, visto que espécies que não possuem este cromossomo adicional também são portadoras desta sequência.

Os snRNAs (small nuclear RNA) são um subconjunto de RNAs e estão envolvidos no processamento do RNAm, compondo a maquinaria do spliceossomo. Os snRNAs U1, U2, U4, U5 e U6 atuam na remoção dos íntrons do pré RNAm durante o splicing (VALADKHAN, 2005). Apesar de serem sequências altamente conservadas, o padrão de distribuição cromossômica do snRNA U2 apresenta-se variável, podendo estar compartimentalizado em um ou mais pares ou disperso pelos cromossomos (ÚBEDA-MANZARANO et al. 2010; UTSUNOMIA et al. 2014). Silva et al. (2015) analisaram diferentes espécies do gênero *Astyanax*: *Astyanax altiparanae*, *Astyanax jordani*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni*, e *A. paranae*, sendo este último pertencente ao complexo *A. scabripinnis*, e encontraram sítios compartimentalizados em dois pares cromossômicos em todas as espécies, exceto para *A. jordani* que apresentou essa sequência em apenas um par. Além disso, os autores não observaram a ocorrência de sintenia entre snRNA U2 e DNAr 5S, como ocorrido para a espécie *Astyanax cf. intermedius* do presente estudo. A sintenia entre essas duas sequências segue a predisposição da clusterização dos chamados genes housekeeping ou genes de manutenção, os quais são altamente expressos e essenciais para as atividades celulares básicas (LERCHER et al. 2002, MALIMPENSA et al. 2018). Diferentemente do observado em *Astyanax*, para outros gêneros de peixes como *Bergiaria* (MALIMPENSA et al. 2018) e *Triportheus* (YANO et al. 2017), a clusterização dessas sequências podem ser observadas com frequência. Atualmente, o snRNA U2 vem se mostrando um importante marcador cromossômico nos estudos de diferentes espécies de peixes (UTSUNOMIA et al. 2014), podendo ser de grande utilidade dentro do complexo, a fim de estabelecer relações entre as espécies.

As histonas são classificadas em H1, H2A, H2B, H3 e H4 e atuam no processo de compactação do DNA durante a formação do nucleossomo (MARTINS et al. 2011). Para o complexo *A. scabripinnis* poucos estudos foram realizados até o momento envolvendo essas sequências. Silva et al. (2014) analisaram uma população de *A. paranae* e encontraram sintenia entre H1, H3 e H4 em posição terminal do braço p de dois pares cromossômicos (metacêntrico e acrocêntrico), além da presença de um sítio de H1 em um cromossomo B. Já Barbosa et al. (2017) analisaram três populações de *A. scabripinnis* e também encontraram sintenia, em todas as populações, entre H3 e H4 em posição terminal do braço p em dois pares cromossômicos (metacêntrico e submetacêntrico). Para *A. bockmanni* também foi verificada a ocorrência de sintenia entre H1, H3 e H4 (SILVA et al. 2013), assim como Pansonato-Alves et al. (2013) também observaram a associação entre H1 e H3 em *A. fasciatus*. Desse modo, pode-se dizer que a ocorrência de sintenia entre sítios de histonas é fato recorrente e marcante para o grupo. Além disso, Piscor & Parise-Maltempi (2016), analisando diferentes espécies de *Astyanax* (*A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Astyanax eigenmanniorum* e *Astyanax mexicanus*) encontraram a sequência de H3 clusterizada em um ou dois pares cromossômicos. Sendo assim, o padrão fracamente disperso de H3 e H4 encontrado nas espécies do presente trabalho, pode ser devido à associação com TEs, fazendo com que essas sequências se tornem dispersas pelo genoma e muito provavelmente não sejam mais genes de histonas.

A maior parte do genoma dos teleósteos é composta predominantemente por elementos transponíveis (TE) (CARDUCCI et al. 2018). As sequências Rex (Retroelemento de *Xiphophorus*) são TEs classificados como retrotransposons (Rex1, Rex3 e Rex6), os quais foram isolados primeiramente do peixe modelo *Xiphophorus* (VOLFF et al. 1999,

2000, 2001). Cada vez mais essas sequências vêm sendo utilizadas no mapeamento cromossômico de diferentes grupos de peixes, uma vez que esses organismos podem apresentar grande habilidade em incorporar elementos transponíveis em seu genoma (CARDUCCI et al. 2018). O trabalho realizado por Silva et al. (2014) mapeou as sequências de Rex1 e Rex3 em *A. paranae*, os quais mostraram-se dispersos pelos cromossomos e alocados em regiões heterocromáticas de cromossomos acrocêntricos, respectivamente. Pessenda et al. (2018) também encontraram padrão disperso de Rex1 para diferentes espécies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, *A. eigenmanniorum*, *A. fasciatus*, *A. schubarti* e *Astyanax marionae*). Já para uma população de *A. fasciatus* e outra de *A. bockmanni*, a sequência Rex3 foi encontrada clusterizada em diferentes pares cromossômicos (PANSONATO-ALVES et al. 2013 e SILVA et al. 2013, respectivamente). O padrão disperso encontrando tanto para Rex1 quanto para Rex3 não só no presente trabalho, como para outras espécies de *Astyanax*, pode ser explicado pelo fato dos TEs poderem exibir variação na sua estrutura, tamanho e mecanismos de transposição, podendo assim haver diferentes linhagens nos genomas (CARDUCCI et al. 2018). Além disso, a ausência de Rex1, como ocorreu para *Astyanax* cf. *intermedius*, já foi observada em outras espécies de peixes, esse fato deve-se possivelmente a rápida divergência e perda frequente dessa sequência, além da possibilidade de transferência horizontal (VOLFF et al. 2001).

Os telômeros são sequências de DNA encontradas na região terminal dos cromossomos, as quais são compostas pela repetição  $(TTAGGG)_n$  e estão presentes em todos os vertebrados (McEACHERN et al. 2000). A presença desta sequência na porção terminal do cromossomo é essencial para a manutenção da integridade e estabilidade cromossômica, além de ser necessária no processo de replicação (BLACKBURN, 2001). Sítios teloméricos presentes tanto em posição terminal quanto intersticial (ITS - Interstitial

Telomeric Site) nos cromossomos podem dar indícios sobre a evolução daquela espécie. Até o momento só foi observado sítios teloméricos restritos aos telômeros dentro do complexo *A. scabripinnis* (FERRO et al. 2003; BARBOSA et al. 2017, presente estudo), contudo a presença de ITS seria de suma importância para indicar possíveis rearranjos que possam ter ocorrido no grupo (BARBOSA et al. 2017), podendo-se assim, fazer possíveis inferências sobre o 2n basal para o complexo.

Os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) geralmente contém de 1 a 6 pares de base (pb), repetidas de 5 a 100 vezes em cada locus (EPPLEN & EPPLEN-HAUPT, 2002). Possuem alto grau de polimorfismo, apresentando comportamento mutacional característico (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Na maioria das vezes, são distribuídos aleatoriamente pelo genoma (MARTINS et al. 2011), mas tendem a apresentar certa predisposição em se agrupar em regiões heterocromáticas, as quais apresentam baixa taxa de recombinação (SCHENEIDER et al. 2015), entretanto arranjos de microssatélites já foram observados dispersos ao longo da eucromatina (GARRIDO-RAMOS, 2017). Os microssatélites são muitas vezes utilizados para a compreensão da evolução de cromossomos específicos, onde costumam apresentar marcação diferencial, como os cromossomos sexuais (CIOFFI et al. 2011; YANO et al. 2004; HATANAKA et al. 2018) e cromossomos Bs (GARRIDO-RAMOS, 2017). As espécies aqui analisadas não apresentaram tais cromossomos, mas na sua maioria, os microssatélites foram importantes para diferenciarem as espécies. Observou-se acúmulo em regiões específicas, como telômeros e centrômeros, mostrando assim, que a distribuição dessas sequências pelo genoma pode não ser tão ao acaso como se pensava (RUIZ-RUANO et al. 2015; UTSONOMIA et al; 2018). Além disso, para alguns microssatélites, foi possível verificar clusters bem definidos em determinados cromossomos, mostrando assim, que

essas sequências podem estar mais compartimentalizadas em determinadas regiões (MALIMPENSA, 2019), mas não chegam a apresentar alguma clusterização específica, tornando-se assim dispersas, mas com certo grau de compartimentalização em alguns cromossomos.

O microssatélite com repetições (GATA) $n$ , o qual é o maior componente do DNA satélite Bkm (*Banded Krait Minor*), foi o que se mostrou mais específico para cada espécie, apresentando padrão diferenciado até mesmo entre os cariomorfos de *Astyanax* cf. *goyanensis*. Barbosa et al. 2017 também encontraram essas sequências em cromossomos específicos em diferentes populações de *A. scabripinnis*. Desse modo, pode-se sugerir que as repetições (GATA) $n$  mostram-se como relevante marcador dentro do complexo *A. scabripinnis*.

As espécies do complexo *A. scabripinnis* são consideradas como peixes de pequeno porte, sendo encontradas em pequenos riachos ou, na maioria das vezes, restritas as cabeceiras de pequenos tributários (BRITSKI, 1972), fator esse que pode ser considerado importante para a diversificação desse grupo de peixes, pois o fato de as populações terem suas distribuições restritas a cabeceiras, o que faz com que as calhas dos rios principais se tornem barreiras naturais, impedindo assim, sua dispersão, fato que leva a ocorrência de diferentes isolados, o que as tornam mais propensas a mudanças evolutivas, que podem ser rapidamente estabelecidas, aumentando, assim, cada vez mais sua biodiversidade (PAZZA & KAVALCO, 2007; CIOFFI et al. 2018).

No presente trabalho, os exemplares da população do ribeirão Grande (bacia do rio Paraíba do Sul) foram identificados como *Astyanax* cf. *intermedius*. Kavalco & Moreira-Filho (2003) e Kavalco et al. (2007), analisaram uma população de *A. intermedius*, proveniente do rio Paraitinga, também pertencente a bacia do rio Paraíba do Sul. Os dados

citogenéticos obtidos nesses trabalhos, como:  $2n=50$ , elevado número de cromossomos acrocêntricos e conseqüentemente baixo NF, AgRONS restritas a cromossomos acrocêntricos, elevado número de sítios de DNAr 18S e ausência de hibridização da sequência As51, estão de acordo com os dados obtidos no presente estudo, além da localidade-tipo para a espécie estar localizada também na bacia do rio Paraíba do Sul. Desse modo, levando-se em conta a comparação de todos esses dados, pode-se dizer que a espécie do presente estudo se trate realmente de *A. intermedius*.

Para *Astyanax* aff. *scabripinnis*, os dados obtidos no presente trabalho aliados aos da literatura e sua ampla distribuição pela bacia do Alto rio Paraná, também permitem considerar que a identificação da espécie esteja de acordo com as características citogenéticas de *A. scabripinnis*. Já para *A. goyanensis*, Bertaco et al. 2010 realizaram a redescrição da espécie com base na série-tipo e topótipos originais e ambas foram coletadas em um pequeno tributário do rio dos Couros, bacia do rio Tocantins, na região da Chapada dos Veadeiros, em Goiás. A população de *Astyanax* cf. *goyanensis* do presente estudo foi coletada nessa mesma região (ribeirão das Brancas, Água Fria de Goiás – GO, bacia do rio Tocantins, próximo a Chapada dos Veadeiros), contudo esse é o primeiro trabalho de caracterização citogenética para a espécie, portanto não há dados cromossômicos disponíveis para comparação, somente podemos compará-la com a localidade para onde foi descrita, tratando-se, assim, da mesma região.

Téran et al. (2020) consideram que a definição filogenética de *Astyanax* é um dos mais relevantes desafios para a sistemática de peixes neotropicais, uma vez que apesar de tratar-se de um gênero amplamente diverso, as espécies são muito semelhantes entre si, muitas vezes com detalhes bem conservados, dificultando assim, a distinção entre elas. Estes autores renomearam várias espécies e indicam clados mais estreitos entre algumas

espécies das 98 estudadas por eles, entretanto os mesmos reconhecem que somente com seus estudos, os quais apresentaram dados congruentes e estáveis, ainda não é possível propor uma filogenia definitiva para *Astyanax*, uma vez que é preciso considerar mais espécies e expandir o estudo, o que demanda também o aumento de caracteres na matriz de dados.

Por fim, os dados citogenéticos obtidos no presente estudos demonstram que as espécies pertencentes ao complexo *A. scabripinnis* aqui analisadas: *Astyanax* aff. *scabripinnis*, *Astyanax* cf. *intermedius* e *Astyanax* cf. *goyanensis*, apresentam caracteres cromossômicos conservados como: número diplóide, padrão de distribuição de sequência telomérica, Rex1 e Rex3. Entretanto, a presença de caracteres cromossômicos variáveis se sobressai entre as espécies, mostrando uma diversidade no que se refere à morfologia cromossômica, padrão de bandamento C, número de sítios e localização de AgRONS, distribuição cromossômica de DNAs repetitivos (DNAr 18S e 5S, As51, snRNA U2, H3, H4 e microssatélites). De um modo geral, o presente estudo vem contribuir para o conhecimento da diversidade genética do complexo de espécies *A. scabripinnis*, evidenciando que a dinâmica cromossômica apresentada pela análise dos DNAs repetitivos permitiu um melhor conhecimento acerca da composição genômica do complexo e demonstrando sua grande diversificação ao nível de microestrutura cariotípica, além da diversificação na macroestrutura cariotípica observadas já com a citogenética clássica.

Os dados da citogenética clássica e molecular, aqui obtidos, não só reforçam a biodiversidade existente no grupo, como podem ter um importante papel no auxílio da taxonomia e biologia evolutiva do grupo, uma vez que por esses dados é possível afirmar que há unidades dentro do complexo que podem ser muito bem delimitadas com o auxílio citogenético, mostrando a ocorrência de características cromossômicas exclusivas de cada

espécie, evidenciando assim, a importância da associação de diferentes dados e ferramentas para o entendimento da diversidade a qual um complexo de espécie está envolvido.

**Tabela 6:** Revisão dos trabalhos citogenéticos do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*.

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula cariotípica	NF	AgRONS	Bs (n°/morfologia)	DNAs repetitivos	Referência
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	córrego dos Bicudos, Brotas, SP	Tietê	50	8m+20sm+14(12)st+8(10)a	90/92	-	0	-	Morelli et al. 1983
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Centenário, Maringá, PR	Paranapanema	50	6m+20sm+8st+16a	84	-	0	-	Moreira-Filho & Bertollo, 1991
	córrego das Marrecas, Londrina, PR	Paranapanema	48	6m+20sm+12st+10a	86	-	0		
	córrego Curral das Éguas, Três Marias, MG	São Francisco	46	6m+22sm+8st+10a	82	-	0		
	córrego Viveiro de Mudanças, Três Marias, MG	São Francisco	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	0		
	córrego Barreiro Grande, Três Marias, MG	São Francisco	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	0		
	rio Claro, Salesópolis, SP	Tietê	50	6m+24sm+8st+12a	88	-	0		
	rio Monjolinho, São Carlos, SP	Tietê	50	6m+24sm+8st+12a	88	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego das Pedras (alt. 1720m), Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde	-	Salvador & Moreira-Filho, 1992
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	rio Araquá, Botucatu, SP	Tietê	50	4m+30sm+4st+12a	88	múltipla	0-1/m gde	-	Maistro et al. 1992
<i>Astyanax scabripinnis</i>	rio Jacu, Vitor Hugo, ES	Costeira	50	6m+8sm+36a	64	múltipla	0-4/micro	-	Rocon-Stange & Almeida-Toledo, 1993
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Alto rio Paraná	50	8m+22sm+10st+10a	90	múltipla	0-1/m gde	-	Maistro et al. 1994a
<i>Astyanax scabripinnis</i>	rio das Pedras, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde	-	Fauaz et al. 1994
			2n=3x=75	9m+33sm+15st+18a		-			
<i>Astyanax scabripinnis</i>	rio Araquá, Botucatu - SP	Alto rio Paraná	50	4m+30sm+4st+12a			0-1/m gde	-	Maistro et al. 1994b
			2n=3x=75	6m+45sm+6st+18a		simples			
	córrego das Pedras, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a		-	0-2/m gde		
			2n=3x=75	9m+33sm+15st+18a		simples			
<i>Astyanax scabripinnis</i>	ribeirão Canta Galo, Itirapina, SP	Tietê	50	4m+26sm+4st+16a	84	-	0	-	Souza et al. 1995
			48	6m+22sm+8st+12a	84	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	ribeirão Canta Galo, Itirapina, SP	Tietê	48	6m+22sm+8st+12a	84	simples	0	-	Souza et al. 1996
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego das Pedras, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0-2/m gde	-	Vicente et al. 1996
	ribeirão do Casquilho, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0-1/m gde		
	ribeirão das Perdizes, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0-2/m gde		
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Alto rio Paraná	50	8m+22sm+10st+10a	90	-	0-1/m gde	-	Porto-Foresti et al. 1997
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Yukatan, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+30sm+4st+10a	90	-	0-1/m gde	-	Mizoguchi & Martins-Santos, 1997
	rio Água do Rancho, Maringá, PR	Alto rio Paraná	50	6m+28sm+16a	84	-	0-2/ micro		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Yukatan, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+30sm+4st+10a	90	-	0-1/m gde	-	Mizoguchi & Martins-Santos, 1998a
	córrego Ligeiro, Maringá, PR	Ivaí	48	10m+22sm+2st+14a	82	-	0		
	córrego Sarandi, Maringá, PR	Paranapanema	50	6m+26sm+4st+14a	86	-	0		
	rio Água do Rancho, Maringá, PR	Alto rio Paraná	50	6m+28sm+16a	84	-	0-2/ micro		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Yukatan, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+30sm+4st+10a	90	múltipla	0-1/m gde	-	Mizoguchi & Martins-Santos, 1998b

	córrego Ligeiro, Maringá, PR	Ivaí	48	10m+22sm+2st+14a	82	múltipla	0		
	córrego Sarandi, Maringá, PR	Paranapanema	50	6m+26sm+4st+14a	86	múltipla	0		
	rio Água do Rancho, Maringá, PR	Alto rio Paraná	50	6m+28sm+16a	84	múltipla	0-2/ micro		
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	córrego Grande, Pardinho, SP	Paranapanema	50	6m+26sm+8st+10a	82	múltipla	0	-	Maistro et al. 1998
	córrego São Pedro, Itatinga, SP	Paranapanema	50	6m+24sm+8st+12a	80	múltipla	0		
	rio Claro, Botucatu, SP	Pardo	50	6m+28sm+6st+10a	84	múltipla	0		
	rio Pardo, Pardinho, SP	Pardo	50	6m+26sm+6st+12a	84	múltipla	0		
	córrego das Pedras, Itatinga, SP	Pardo	50	6m+28sm+4st+12a	84	múltipla	0		
	rio Araquá, Botucatu, SP	Tietê	50	4m+30sm+4st+12a	84	múltipla	0		
	rio Capivara, Botucatu, SP	Tietê	50	8m+22sm+10st+10a	90	múltipla	0		
	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Tietê	50	8m+22sm+10st+10a	90	múltipla	0		
	rio Lavapés, Botucatu, SP	Tietê	50	6m+26sm+8st+10a	82	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Tamanduá, Itatinga, SP	Paranapanema	50	6m+26sm+4st+14a	86	múltipla	0	-	Maistro et al. 2000
			48	6m+28sm+4st+10a	86	simples	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego das Pedras (alt. 1720m), Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0-2/m gde	As51	Mestriner et al. 2000
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Centenário Maringá, PR	Paranapanema	50	6m+20sm+8st+16a	84	múltipla	0	-	Mantovani et al. 2000
	córrego das Marrecas, Londrina, PR	Paranapanema	48	6m+20sm+12st+10a	86	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Ribeirão Grande (alt. 1920m), Campos do Jordão, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; m peq; sm gde	-	Néo et al. 2000a; 2000b
	córrego Ribeirão Grande (alt. 1800m), Campos do Jordão, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; sm gde		
	córrego Ribeirão Grande (alt. 700m), Campos do Jordão, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Fojo, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	múltipla	0-2/m gde; m peq; sm gde	DNAr 5S; DNAr18S	Ferro et al. 2001
	lagoa Capivari, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	múltipla	0-2/m gde; m peq; sm gde		
	lagoa Carpa, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	múltipla	0-2/m gde; m peq; sm gde		
	córrego da Fazenda Lavrinha, Campos do Jordão, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	múltipla	0-2/m gde; m peq; sm gde		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	ribeirão Canta Galo, Itirapina, SP	Tietê	48	6m+22sm+8st+12a	84			DNAr18S	Souza et al. 2001
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego das Pedras, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde	-	Moreira-Filho et al. 2001
<i>Astyanax scabripinnis</i>	tributário do rio Paranapanema, Botucatu, SP	Alto rio Paraná	50	8m+18sm+10st+14a	86	-	0	-	Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Alto rio Paraná	50	8m+22sm+10st+10a	90	simples	0-1/m gde	-	Maistro et al. 2001
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego São Domingos, Maringá, PR	Ivaí	48	10m+20sm+8st+10a	86	múltipla	0-1/m peq	-	Alves & Martins-Santos, 2002
	córrego Tamboara, Paranavaí, PR	Ivaí	48	10m+24sm+6st+8a	88	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Amores, Cianorte, PR	Ivaí	48	8m+24sm+4st+12a	84	múltipla	0	-	Fernandes & Martins-Santos, 2003
	rio Índios, Cianorte, PR	Ivaí	48	8m+20sm+6st+14a	82	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego da Fazenda Lavrinha, Campos do Jordão, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; sm gde	telomérica	Ferro et al. 2003
	córrego Fojo, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; m peq; sm gde		
	lagoa Capivari, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde		
	lagoa Carpa, Campos do Jordão, SP	Sapucaí-Guaçu	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; sm gde		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	rio Macacos	Paraíba do Sul	50	8m+20sm+8st+14a	86	múltipla	0	DNAr18S	Kavalco & Moreira-Filho, 2003

<i>Astyanax intermedius</i>	rio Paraitinga	Paraíba do Sul	50	6m+8sm+4st+32a	68	múltipla	0		
<i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i>	córrego Apertados, Londrina, PR	Tibagi	48	6m+22sm+4st+16a	80	múltipla	0	DNAr 18S	Cristina, A et al. 2003
			2n=3x=72	9m+33sm+6st+24a	144	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Centenário, Maringá, PR	Parapananema	50	6m+20sm+8st+16a	84	múltipla	0	As51	Mantovani et al. 2004
	córrego das Marrecas, Londrina, PR	Parapananema	48	6m+20sm+12st+10a	86	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Tatupeba, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+22sm+6st+16a	84	-	0-1/m gde	-	Fernandes & Martins-Santos, 2005
			48	8m+26sm+6st+8a	88	-	0-1/ m gde; st gde, a gde		
			46	8m+22sm+6st+10a	82	-	0-2/ m gde; a peq		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Centenário, Maringá, PR	Parapananema	50	6m+20sm+8st+16a	84	-	0	DNAr 5S; DNAr18S	Mantovani et al. 2005
	córrego das Marrecas, Londrina, PR	Parapananema	48	6m+20sm+12st+10a	86	-	0		
	córrego Viveiro de Mudas, Três Marias, MG	São Francisco	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	0		
	córrego Curral das Éguas, São Gonçalo do Abaeté, MG	São Francisco	46	6m+22sm+8st+10a	82	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Tatupeba, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+22sm+6st+16a	84	múltipla	0-1/m gde	DNAr 5S; DNAr18S	Fernandes & Martins-Santos, 2006
			48	8m+26sm+6st+8a	88	múltipla	0-1/ m gde; st gde, a gde		
			46	8m+22sm+6st+10a	82	múltipla	0-2/ m gde; a peq		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Cruz da Retirada Bonita, Campina Verde, MG	Paranaíba	50	8m+22sm+12st+8a	92	múltipla	0	-	Santos & Morelli, 2006
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Centenário, Maringá, PR	Parapananema	50	6m+20sm+8st+16a	84	-	0	As51	Abel et al. 2006
	córrego das Marrecas, Londrina, PR	Parapananema	48	6m+20sm+12st+10a	86	-	0		
	córrego Viveiro de Mudas, Três Marias, MG	São Francisco	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	0		
	córrego Curral das Éguas, São Gonçalo do Abaeté, MG	São Francisco	46	6m+22sm+8st+10a	82	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	ribeirão Canta Galo (alt. 720m), Itirapina, SP	Tietê	50	4m+26sm+4st+16a	84	múltipla	0	-	Souza et al. 2007
	ribeirão Canta Galo (alt. 980m), Itirapina, SP	Tietê	50	4m+26sm+4st+16a	84	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	rio Macacos, SP	Paraíba do Sul	50	8m+20sm+8st+14a	86	-	0	As51	Kavalco et al. 2007
<i>Astyanax intermedius</i>	rio Paraitinga, SP	Paraíba do Sul	50	6m+8sm+4st+32a	68	-	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Cambeba, Arcos, MG	São Francisco	50	8m+20sm+6st+16a	84	múltipla	0	-	Biaviti & Maistro, 2007
	rio Machado, São João da Mata, MG	Rio Grande	50	6m+28sm+6st+10a	90	múltipla	0		
	córrego Pedra Branca, Alfenas, MG	Rio Grande	50	6m+24sm+8st+12a	88	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis paranae</i>	rio Verde, PR	Tibagi	50	8m+18sm+10st+14a	86	múltipla	0	DNAr 5S; DNAr18S	Vicari et al. 2008
<i>Astyanax</i> sp. cf. <i>A. scabripinnis paranae</i>	rio Açungui, PR	Ribeira do Iguape	50	8m+18sm+10st+14a	86	múltipla	0		
<i>Astyanax</i> sp.	rio Santo Antônio, PR	Jaguariaíva	48	10m+16sm+10st+12a	84	múltipla	0		
<i>Astyanax</i> sp.	rio Jaguariaíva, PR	Jaguariaíva	48	10m+16sm+10st+12a	84	múltipla	0		
<i>Astyanax</i> sp. D	rio Bicudo, PR	Alto rio Iguaçu	50	4m+24sm+6st+16a	84	-	0	-	Kantek et al. 2008
	rio Poço Claro, PR	Alto rio Iguaçu	50	4m+24sm+6st+16a	84	-	0		
	córrego sem nome, PR	Alto rio Iguaçu	50	4m+24sm+6st+16a	84	-	0		
<i>Astyanax laticeps</i>	rio Forquetinha, Forquetinha, RS	Taquari-Antas	50	6m+16sm+16st+12a	88	múltipla	0	DNAr18S	Da Rosa et al. 2009
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego das Pedras (alt. 1720m)	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-1/m gde	As51; DNAr 5S; DNAr18S	Vicari et al. 2011
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Tietê	50			múltipla	0-2/m gde	DNAr 5S;	Santos et al. 2012a

	córrego Cintra, Botucatu, SP	Tietê	50	4m+18sm+16st+12a	90	múltipla	0	DNAr18S	
	córrego Funari, Botucatu, SP	Tietê	50	6m+20sm+14st+10a	88	múltipla	0		
	córrego Capão Bonito, Botucatu, SP	Parapanema	50	6m+16sm+14st+14a	86	múltipla	0		
	cachoeira Barbosa, Botucatu, SP	Parapanema	50	6m+16sm+14st+14a	86	múltipla	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Cascatinha, Botucatu, SP	Tietê	50	6m+16sm+14st+14a	86	múltipla	0-2/m gde	-	Santos et al. 2012b
			2n=3x=75	9m+39sm+12st+15a		múltipla	0-2/m gde; a peq		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	ribeirão Grande (alt. 662m), Pindamonhangaba, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0	DNAr 5S; DNAr18S	Castro et al. 2015
	ribeirão Grande (alt. 1850m), Pindamonhangaba, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde; sm gde		
	córrego das Pedras (alt. 1590m), Campos do Jordão, SP	Sapucai	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	0-2/m gde		
	córrego Tatupeba (alt. 400m), Maringá, PR	Ivaí	50	6m+22sm+6st+16a	84	-	0-1/m gde		
48			8m+26sm+6st+8a	88	-	0-1/ m gde; st gde, a gde			
<i>Astyanax aff. scabripinnis</i>	ribeirão Grande, Pindamonhangaba, SP (alt.662m)	Paraíba do Sul	50	4m+22sm+10st+12a	82	-	0	DNAr 5S; DNAr18S	Castro et al. 2014
	ribeirão Grande, Pindamonhangaba, SP (alt.1850m)	Paraíba do Sul	50	4m+22sm+10st+12a	82	-	0-1/m gde		
<i>Astyanax paranae</i>	córrego Pindorama, PR	Alto rio Paraná	48	8m+20sm+10st+10a	86	múltipla	0	-	Yano et al. 2014
	córrego Lopei, PR	Alto rio Paraná	48	8m+20sm+10st+10a	86	múltipla	0		
<i>Astyanax paranae</i>	rio Capivara, Botucatu, SP	Tietê	50	8m+12sm+14st+16a	84	múltipla	0-1/m gde; sm gde	DNAr 5S; DNAr18S; H1; H3; H4; Rex1; Rex3	Silva et al. 2014
<i>Astyanax paranae</i>	rio Cascatinha, Botucatu, SP	Tietê	50	8m+22sm+10st+10a	90	-	0-2/m gde	DNAr 5S; ; H1; H3; U1; U2	Silva et al. 2015
<i>Astyanax aff. scabripinnis</i>	córrego da Fazenda Lavrinha, Guaratingueta, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0-1/m gde	DNAr 5S; DNAr18S; As51	Barbosa et al. 2015
	ribeirão Grande, Pindamonhangaba, SP	Paraíba do Sul	50	6m+22sm+10st+12a	88	simples	0		
	córrego Tatupeba, Maringá, PR	Ivaí	50	6m+22sm+6st+16a	96	simples	0		
<i>Astyanax scabripinnis</i>	córrego Fazenda Lavrinha, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+10a	88	simples	0-1/m gde	DNAr 5S; DNAr18S; As51; H3, H4; telomérica; microsatélites	Barbosa et al. 2017
	lago do Pedalinho, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+10a	88	simples	0-1/m gde		
	ribeirão das Perdizes, Campos do Jordão, SP	Alto rio Paraná	50	6m+22sm+10st+10a	88	simples	0		
<i>Astyanax pirapuan</i>	córrego Aricá Mirim, Santo Antônio do Leverger, MT	Alto rio Paraguai	50	6m+14sm+14st+16a	84	múltipla	0	DNAr 5S; DNAr18S	Teixeira et al. 2018
	córrego Cupim, Santo Antônio do Leverger, MT	Alto rio Paraguai	50	6m+14sm+14st+16a	84	múltipla	0		
<i>Astyanax aff. scabripinnis</i>	ribeirão dos Negros, São Carlos, SP	Alto rio Paraná	50	6m+26sm+2st+16a	84	múltipla	0	DNAr 5S; DNAr 18S; As51; U2; H3; H4;	Presente Estudo
<i>Astyanax cf. intermedius</i>	ribeirão Grande, Pindamonhangaba, SP	Paraíba do Sul	50	4m+10sm+36a	64	múltipla	0		
<i>Astyanax cf. goyanensis</i>	ribeirão das Brancas, Água Fria de Goiás, GO	Tocantins	50	6m+26sm+18a	82	simples	0		
			50	4m+32sm+14a	86	simples	0		

\*SP Estado de São Paulo; PR Estado do Paraná; MG Estado de Minas Gerais, ES Estado do Espírito Santo; MT Estado do Mato Grosso; GO Estado de Goiás; 2n Número Diploide; NF Número Fundamental; m metacêntrico; sm submetacêntrico; st subtelocêntrico; a acrcêntrico; gde grande; peq pequeno



*CONSIDERAÇÕES  
FINAIS*

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os exemplares analisados no presente trabalho foram identificados como pertencentes às espécies *Astyanax* aff. *scabripinnis* (ribeirão dos Negros, bacia do rio Alto rio Paraná), *Astyanax* cf. *intermedius* (ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul) e *Astyanax* cf. *goyanensis* (ribeirão das Brancas, bacia do rio Tocantins), sendo que esta última apresentou dois cariótipos distintos, sendo classificada em cariomorfos A e B. Além disso, esse foi o primeiro trabalho sobre caracterização citogenética para a espécie *Astyanax* cf. *goyanensis*.

Com os dados obtidos, foi possível verificar que as espécies analisadas possuem características cromossômicas conservadas, como  $2n=50$  cromossomos, sítios teloméricos e padrão de distribuição cromossômica de Rex1 e Rex3. Entretanto, a presença de caracteres cromossômicos variáveis se sobressai entre as espécies, mostrando uma diversidade no que se refere à morfologia cromossômica, padrão de bandamento C, número de sítios e localização de AgRONS, distribuição cromossômica de DNAs repetitivos (rDNA 18S e 5S, As51, snRNA U2, H3, H4 e microssatélites).

Por fim, o presente estudo vem contribuir para o conhecimento da diversidade genética do complexo de espécies *A. scabripinnis*, demonstrando uma variabilidade não só ao que se refere a sua macroestrutura cariotípica, observada com as técnicas de citogenética clássica, mas também evidenciando uma elevada dinâmica cromossômica apresentada pela análise dos DNAs repetitivos, permitindo um melhor conhecimento acerca da composição citogenômica do complexo, demonstrando sua grande diversificação também a nível de sua microestrutura cariotípica, mostrando assim que os dados citogenéticos, tanto clássicos quanto moleculares, aqui obtidos podem ter importante papel no auxílio à taxonomia e biologia evolutiva do grupo, uma vez que por esses dados é possível afirmar que há

unidades dentro do complexo que podem ser muito bem delimitadas com o auxílio citogenético.



***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.D.S.; MANTOVANI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.3, p.448-452, 2006.

ADEGA, F.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H. Constitutive heterochromatin characterization of White-lipped and Collared peccaries (Tayassuidae). **Journal Genetics**, v.86, p.19-26, 2007.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr., H. F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-MC-CONNELL, R. H. (Ed.) **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 374-399.

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin, Brasil. In: CAROLSFELD, J. et al. (Ed.) **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 2004. p. 19-98.

ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, v.67, p.117-122, 2002.

ANA (Agência Nacional de Águas). Divisões hidrográficas do Brasil. Disponível em: [http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/aguas-no-brasil/panorama-das-aguas/copy\\_of\\_divisoes-hidrograficas](http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/aguas-no-brasil/panorama-das-aguas/copy_of_divisoes-hidrograficas). Acesso em junho de 2020a.

ANA (Agência Nacional de Águas). Tocantins. Disponível em: <https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/tocantins/saiba-mais-tocantins>. Acesso em junho de 2020b.

ANA (Agência Nacional de Águas). Estudos auxiliares para a gestão do risco de inundações, Bacia o rio Paraíba do Sul. Disponível em: <http://gripbsul.ana.gov.br/ABacia.html>. Acesso em junho 2020c.

ARTONI, R.F. et al. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (siluriformes) and *Leporinus elongatus* (characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.39-44, 1999.

ARTONI, R. F. et al. ). *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v.2, n.2, p.197-202, 2006.

BARBOSA, P. et al. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v143, p.55-62, 2015.

BARBOSA, P. Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, v.11, n.1, p.143-162, 2017.

BERTACO, V.A.; CARVALHO, F.R.; JEREP, F.C. *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.8, n.2, p.265-275, 2010.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct Chromosome Preparation from Freshwater Teleost Fishes.. In: OZOUF-COSTAZ, C. et al. (Ed.) **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. Florida: CRC Press, 2015, p. 21-26.

BIAVITI, S.H.; MAISTRO, E.L. Cytogenetical analyses in three *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae) from Minas Gerais State, Brazil. **Cytologia**, v.72, n.3, p.357-361, 2007.

BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v.106, p.661-673, 2001.

BRASSESCO, M.S. et al. Comparative cytogenetics studies of Curimatide (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.293–301, 2004.

BRITISKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: **Comissão Internacional da Bacia Paraná-Uruguaí: Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca., p.79-108. 1972.

BRITSKI, H.A.; SATO Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias** (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Minas Gerais: Ministério da Irrigação-CODEVASF, 1988. 115p.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195p.

CARDUCCI, F. et al. Rex Retroelements and Teleost Genomes: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1-15, 2018.

CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. B chromosomes: na update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v.72, p.1907-1932, 2008.

CASTRO, J.P. et al. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.12, n.2, p.429-438, 2014.

CASTRO, J.P. et al. 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**, v.25, p.231-244, 2015.

CAVALLINI M. M.; BERTOLLO L. A. C. Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: **II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS**, 1988, Maringá, p.32.

CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v.371, p.215-220, 1994.

CIOFFI, M.B. et al. Conventional Cytogenetic Approaches—Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. **Current Genetic Medicine Reports**, v.6, p.176-186, 2018.

COLGAN, D. et al. Histone H3 and U2snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v.46, p.419-437, 1998.

CORNELIO, D. et al. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.27, p. 681-689, 2017.

CORRADINI, N. et al. *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. **Heredity**, v.98, p.3-12, 2007.

CREMER, T.; CREMER, M. Chromosome territories. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2(3):a003889, 2010.

CRISTINA, A. et al. Natural Triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. **Cytologia**, v.68, n.3, p.267-270, 2003.

CROSS, I. et al. Molecula and cytogenetic characterization of *Crassostrea angulata* chromosomes. **Aquaculture**, v.247, p.135-144, 2005.

DA ROSA, R. et al. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p.601-605, 2009.

DANIEL-SILVA, M.F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v.54, n.3, p.209-215, 2001.

EPPLEN, J.T. et al. Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.3798-3802, 1982.

EPPLEN, J. T.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R. C.; OBE, G.; ATHWAL, R. S. **Some aspects of chromosome structure and functions**. Índia: Narosab Publishing House, 2002. p.1-10.

FAJKUS, J. et al. Evolution, Composition and Interrelated Functions of Telomeres and Subtelomeres: Lessons from Plants. In: NOSEK, J.; TOMÁSKA, L. **Origin and Evolution of Telomeres**. USA: Landes Bioscience, 2008. p.114-127.

FAUAZ, G.; VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, v.17, n.2, p.157-163, 1994.

FELDBERG, E. et al. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. 2. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome*, v.36, p.372–376, 1993.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic Characterization of Two Populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basin PR Brazil. *Cytologia*, v.68, n.3, p.289-293, 2003.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Parana, Brazil. *Genetica*, v.124, p.301-306, 2005.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Parana, Brazil. *Caryologia*, v.59, n.3, p.253-259, 2006.

FERREIRA-NETO, M. et al. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, v.6, n.1, p.29-40, 2012.

FERRO, D.A.M. et al. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*, v.110, p.55-62, 2001.

FRICKE R.; ESCHMEYER W.; FONG J.D. Species by Family/subfamily in the Catalogo of Fishes. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em junho de 2020.

GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA: na evolving topic. *Genes*, 8:230. 10.3390/genes8090230, 2017.

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 de Livre-Docência, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, 1995.

GAVAZZONI, M. et al. Morphologically Cryptic Species of the *Astyanax bimaculatus* “Caudal Peduncle Spot” Subgroup Diagnosed Through Cytogenetic Characters. **Zebrafish**, v.15, n.4, p.382-388, 2018.

GAVAZZONI, M. et al. Detection of natural hybridization and delimitation of two closely related operational taxonomic units of the *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characidae) complex through integrative approaches. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.129, n.3, p.687-700, 2020.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E.J.G. The Smithsonian Atlas of the Amazon. Washington: Smithsonian Books, 2003. 253 p.

GRAÇA, W.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes.** Maringá: EDUEM, 2007. 241 p.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an an-aesthetic and method of sampling intertidal rock-pool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

GRIFFITHS, J. F. et al. **Introdução à genética.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

HASHIMOTO, D.T. et al. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p.64-71, 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**, v.122, p.239-244, 2004.

HILSDORF, A.W.S.; PETRERE Jr., M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v.30, n.180, p. 62-65, 2002.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

IJDO, J.W. et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4780, 1991.

INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F. A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguazu basin, southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.12, n.2, p.281-290, 2014.

ĨNIGO, R.E.; FERNANDÉZ-CALVÍN, B.; GARCÍA DE LA VEGA, C.. Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: in situ localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). **Heredity**, v.70, p.70-76, 1996.

INNOCÊNCIO, N.R. Hidrografia. In: **Geografia do Brasil, Região Centro-Oeste**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 1989. p.73-90.

KANTEK, D.L.Z. et al. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguazu River. **Genetics and Molecular Research**, v.31, p.239-242, 2008.

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

KAVALCO, K.F. et al. Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.529-535, 2007.

KUBAT, Z.K.Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v.51, p.350-356, 2008.

LANGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v.7, n.3, p.181-197, 2007.

LANGANI, F. et al. Peixes de água doce. In: ROCHA, R. M.; BOEGER, W.A. **Estado da arte e perspectivas para zoología no Brasil**. Curitiba: Editora UFPR, 2009. p. 211-230.

LERCHER, M.J.; URRUTIA, A.O.; HURST, L.D. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. **Nature Genetics**, v.31, n.2, p.180-183, 2002.

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

LI, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.

LIMA, F.C.T. et al. Genera incertae sedis in Characidae. In REIS, R.E.; SVEN, O.K.; FERRARIS, Jr. C.J. (Ed.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-168.

LIMA, F.C.T.; CAIRES, R.A. Peixes da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, bacias dos Rios Tocantins e São Francisco, com observações sobre as implicações biogeográficas das “águas emendadas” dos Rios Sapão e Galheiros. **Biota Neotropica**, v.11, n.1, p.231-250, 2011.

LOHE, A. R.; HILLIKER, A. J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetics & Development**, v.5, p.746-755, 1995.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The Repetitive DNA content of Eukaryotic Genomes, In: GARRIDO-RAMOS, M.A. (Ed.) **Repetitive DNA**. Basel: Karger, 2012. p. 1-28.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. 158p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas -Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v.87, p.433-438, 2012.

MAISTRO, E.L. et al. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v.87, p.101-106, 1992.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.2, p.153-156, 1994a.

MAISTRO, E.L. et al. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B chromosomes. **Caryologia**, v.47, n.3-4, p.233-239, 1994b.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.2, p.201-206, 1998.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.365-369, 2000.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica**, v.110, p.177-183, 2001.

MALIMPENSA, G.C. et al. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.154, n.2, p.99-106, 2018.

MALIMPENSA, G.C. **Investigação da diversificação e evolução cromossômica em espécies de Pimelodidae (Siluriformes): contribuição dos DNAs repetitivos e cromossomos B**. 146p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, 2019.

MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v.109, p.161-168, 2000.

MANTOVANI, M. et al. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.536-542, 2004.

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

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

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C.R. (Ed.) **Focus on Genome Research**. New York: Nova Science Publishers, 2004. p.289-318.

MARTINS, C. et al. **Animal Genomes Under the Focus of Cytogenetics**. New York: Nova Science Publishers, 2011. 160p.

MCEACHERN, M. J.; KRAUSKOPF, A.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and their control. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.331-358, 2000.

MELES, S. et al. The karyotype and sex chromosomes of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): a detailed characterization. **Micron**, v.39, p.559-568, 2008.

MELO, F.A.G. **Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2005.

MESTRINER, C.A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v.85, p.1-9, 2000.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v.127, p.249-253, 1997.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.1, p.1-11, 1998a.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia**, v.63, p.259-265, 1998b.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A. *Astyanax Scabripinnis* (Pisces, Characidae): A Species Complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v.14, n.2, p.331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O. et al. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in diferente species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v.66, p.59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P.M.; BERTOLLO, L.A.C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): Na overview in natural populations. **Cytogenetics and Genome Research**, v.106, p.230-234, 2004.

MORELLI, S. et al. Cytogenetic Considerations on the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. **Caryologia**, v.36, n.3, p.235-244, 1983.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.; WILSON, M.V.H. **Fishes of the world**. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707p.

NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O; CAMACHO, J.P.M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v.85, p.136-141, 2000a.

NÉO, D.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.108, p.211-215, 2000b.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v.39, p.121-152, 2005.

PAIZ, L.M. et al. Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. **Comparative Cytogenetics**, v.9, n.1, p.54-65, 2015.

PANSONATO-ALVES, J.C. et al. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric

Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.141, p.133-142, 2013.

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v.112, p. 313-319, 2006.

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F. Chromosomal evolution in the Neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Nucleus**, v.50, n.3, p.519-543, 2007.

PESSENDA, G. et al. Chromosomal organization of retrotransposon Rex1 in *Astyanax* species (Characiformes, Characidae). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v.71, n.1, p.80-84, 2018.

PIMPINELLI, S. et al. The peculiar genetic organization of *Drosophila* heterochromatin. **Trends in Genetics**, v.2, p.17-20, 1986.

PINEAU, P. et al. A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, p.582-588, 2005.

PINHEIRO, A.P.B. et al. Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids. **Scientific Reports**, v.9, p.1-12, 2019.

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

PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Microsatellite Organization in the B Chromosome and A Chromosome Complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species. **Cytogenetic and Genome Research**, v.148, p.44-51, 2016.

PORTO-FORESTI, F. et al. Estimated frequency of B chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.3, 377-380, 1997.

REBOUÇAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Ed.) **Águas doces no Brasil – Capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo: ESCRITURAS, 2008. 750p. 1-35.

ROSSI, F. et al. Cytogenetic and molecular characterization of heterochromatin. Gene models in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.175, p.595–607, 2007.

RUIZ-RUANO, F.J. et al. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma**, v.124, p.221–234, 2015.

SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v.69, p.50-56, 1992.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Laboratory Press, 2001. 2344p.

SANTOS, A.C.; MORELLI, S. Cytogenetics comparison of two *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) populations of from Triangulo Mineiro region. **Bioscience Journal**, v.22, n.1, p.145-150, 2006.

SANTOS, N.M. A. et al. Comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). **Zoologia**, v.29, n.2, p.159-166. 2012a.

SANTOS, N.M.A. et al. Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. **Caryologia**, v.65, n.1, p.40-46, 2012b.

SCHEEL, J.J. **Fish chromosomes and their evolution**. Denmark: Interval Report of Danmarks Akvarium, 1973. 22p.

SCHNEIDER, C.H. et al. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). *Comparative Cytogenetics*, v.9, n.4, p.595-605, 2015.

SCHUWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. In: Stahl A et al. (Ed.) **Chromosomes Today**. London: Allen & Unwin, 1987. p.61-74.

SILVA, D.M.Z. et al. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, v.141, p.329-336, 2013.

SILVA, D.M.Z. et al. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **Plos One**, v.9, n.4, p.1-10, 2014.

SILVA DMZA et al. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and Association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v.146, p.144-152, 2015.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia**, v.60, p.273-281, 1995.

SOUZA, I.L. et al. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, v.66, p. 85-9, 2001.

SOUZA, I.L.; VENERE, P.C.; MOREIRA-FILHO, O. Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). **Cytologia**, v.72, n.1, p.63-69, 2007.

SUMNER, A. T. A Simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.

TEIXEIRA, T.K.S.S. et al. Comparative cytogenetics of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from the upper Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v.16, p.1-8, 2018.

TENÓRIO, R.C.C.O. et al. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.3, p.553-564, 2013.

TERÁN, G.E.; BENITEZ, M.F.; MIRANDE, J.M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, XX, p.1-18, 2020.

ÚBEDA-MANZANARO, M. et al. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v.138, p.787-794, 2010.

UTSUNOMIA, R. et al. Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetics and Genome Research**, v.142, p.286-292, 2014.

UTSUNOMIA, R. et al. Particular Chromosomal Distribution of Microsatellites in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). **Zebrafish**, v.15, n.4, p.398-403, 2018.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. **Currente Opinion in Chemical Biology**, v.9, p.603-608, 2005.

VICARI, M.R. et al. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Research**, v.31, p. 173-179, 2008.

VICARI, M.R. et al. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v.139, p. 1073-1081, 2011.

VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a b chromossome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.74, p.70-75, 1996.

VOLFF, J.N. et al. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.1427-1438, 1999.

VOLFF, J.N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, p.1673-1684, 2000.

VOLFF, J.N. et al. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v.52, p.351-360, 2001.

YANO, C.F.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: Incertae Sedis)

species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. **Biologia**, v.69, n.6, p.790-798, 2014.

YANO, C.F. et al. Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish**, v.14, n.2, p.146-154, 2017.