

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCO AURÉLIO TONELOTTO**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIMES DO GRUPO *Hoplias*  
*malabaricus* (Bloch, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO MUNICÍPIO  
DE SANTA HELENA, PARANÁ.**

**SANTA HELENA**

**2022**

**MARCO AURÉLIO TONELOTTO**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIMES DO GRUPO *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA, PARANÁ.**

**Cytogenetic characterization of specimens of the group *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) from the municipality of Santa Helena, Paraná.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).  
Orientador: Daniel Rodrigues Blanco.

**SANTA HELENA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**MARCO AURÉLIO TONELOTTO**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIMES DO GRUPO *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO MUNICÍPIO DE SANTA HELENA, PARANÁ.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 09 de dezembro de 2022

---

Daniel Rodrigues Blanco  
Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Santa Helena

---

Vanessa Bueno da Silva  
Doutora em Biologia Comparada  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Santa Helena

---

Natália Lima Lira  
Doutoranda em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

**SANTA HELENA**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família, pelos  
momentos de ausência.

## AGRADECIMENTOS

Certamente que me esquecerei de alguém que fez parte da minha vida nestes quatro anos de graduação, e que com toda certeza me ajudou para que este momento chegasse. Mas saiba que ainda assim, em meus sinceros sentimentos, sou eternamente grato pela presença na minha vida (mesmo que breve) e o auxílio para a execução desta tarefa tão árdua que é a conclusão da graduação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco, pela sabedoria, pela paciência e pela capacidade com que me guiou nesta trajetória, e principalmente companheirismo, além de sua obrigação como orientador. E a Prof Dr<sup>a</sup> Edicléia Bonini e Silva, por ter me mostrado o primeiro caminho na ciência, e ser quem me despertou o desejo pela Biologia mais ainda.

Agradeço a minha equipe, o GEIN, que também foram responsáveis pela execução da pesquisa, em especial: Natália Lima Lira, Sandro Tonello, Marcos Vinicius Pupo e João Carlos Maicrovicz, pela grande ajuda, em diversas etapas do trabalho. E também a UNIOESTE *Campus* Cascavel (Paraná) por fornecer o laboratório para a execução de determinadas etapas do trabalho, e em especial: Chrystian Haerter, pela paciência e qualidade, em transmitir sua experiência.

Agradecemos, também, ao Laboratório Multiusuário de Santa Helena (LABIQ-SH) pela disponibilidade da estrutura.

Aos meus colegas de sala, em especial aqueles que foram minha companhia desde a ingressão, e que irão me acompanhar fora da Universidade, com toda certeza: Marcos e Gabriele.

A Secretaria do Curso, pela cooperação.

Com toda certeza, minha família, minha mãe Alice; meu pai Sidney e meus irmãos Flávio e Otávio; por todo o apoio emocional, financeiro e por serem as pessoas que sempre acreditarem que este dia iria chegar.

A minha namorada Ana Paula Zingler, pela companhia, paciência, carinho e amor. Ser quem me auxilia nos momentos difíceis do curso, e quem sinceramente torce e comemora, pela minha evolução. Espero passar muitos anos ao seu lado.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta graduação.

*“A educação não é tarefa de um partido defender. A educação é uma tarefa da sociedade levantar a cabeça. Aqueles que já tiveram a oportunidade de ir para a universidade precisam levantar a cabeça para que esse país não sofra no século XXI o mesmo atraso que ele sofreu no século XX”.*

- Luiz Inácio Lula da Silva

## RESUMO

A região Neotropical é considerada única dentre outros ecossistemas terrestres, abrigando alta diversidade de táxons, incluindo peixes. Dentre as famílias de peixes continentais presentes na região, a família Erythrinidae destaca-se por seu endemismo na América do Sul e Central, com ampla distribuição por bacias brasileiras, e sendo representadas por três gêneros, entre eles o *Hoplias* Gill (1903). O gênero *Hoplias* abrange dois grandes grupos, *H. malabaricus* Bloch, 1794 e *H. lacerdae* Miranda, 1908. *H. malabaricus*, abriga diversas espécies, como: *H. malabaricus*, *H. mbigua*, *H. missioneira*, entre outras presentes na área do Alto Paraná. Além de constituir um complexo de espécies, com a presença de 7 cariomorfos, identificados pelo distinto número diploide. Análises citogenéticas clássicas (Coloração por Giemsa e Bandamento C) e moleculares (mapeamento físico de sequências ribossomais repetitivas por Hibridização in situ fluorescente - FISH) foram realizadas, afim de identificar os possíveis cariomorfos e o padrão de distribuição desses DNAs repetitivos, presentes na área de influência do Lago de Itaipu no município de Santa Helena-PR. Foram analisados 16 exemplares, 6 apresentaram  $2n=40$  cromossomos (14m + 26sm, NF = 80) e 7 exemplares apresentaram  $2n=42$  cromossomos (22m + 20sm, NF = 84) caracterizando, assim, como pertencentes aos cariomorfos C e A, respectivamente. Assim, foram selecionados os três melhores (qualidade/quantidade de metáfases) espécimes analisados, sendo 2 indivíduos caracterizados pelo cariomorfo C (1 macho e 1 fêmea) e 1 indivíduo do cariomorfo A (macho). Foram evidenciadas, a partir do Bandamento C regiões heterocromáticas presentes na região pericentromérica na maioria dos cromossomos, independentemente do citótipo. A FISH com sondas de rDNA 5S e rDNA 18S foi realizada nos 3 melhores indivíduos, e evidenciou diferenças significativas entre os exemplares analisados. Destaca-se a ausência de marcação bitelomérica em um dos cromossomos do par 13, somente na fêmea do cariomorfo C, podendo, assim, indicar um polimorfismo, independente do sexo. Para as análises cromossômicas clássicas: as informações obtidas neste estudo são semelhantes às apresentadas em outras literaturas. E reforça a presença dos citótipos A e C na região do Lago de Itaipu.

Palavras-chave: citogenética; *Hoplias*; “Traira”; FISH.

## ABSTRACT

The Neotropical region is considered unique among other terrestrial ecosystems, harboring a high diversity of taxa, including fish. Among the continental fish families present in the region, the Erythrinidae family stands out for its endemism in South and Central America, with a wide distribution in Brazilian basins, and being represented by three genera, among them *Hoplias* Gill (1903). The genus *Hoplias* encompasses two large groups, *H. malabaricus* Bloch, 1794 and *H. lacerdae* Miranda, 1908. *H. malabaricus* includes several species, such as: *H. malabaricus*, *H. mbigua*, *H. missioneira*, among others present in the area of Upper Paraná. In addition to constituting a complex of species, with the presence of 7 karyomorphs, identified by the distinct diploid number. Classical (Giemsa staining and C-banding) and molecular (physical mapping of repetitive ribosomal sequences by fluorescent in situ hybridization - FISH) cytogenetic analyzes were performed in order to identify possible karyomorphs and the distribution pattern of these repetitive DNAs, present in the area of influence of Lake Itaipu in the municipality of Santa Helena-PR. Sixteen specimens were analyzed, 6 approved  $2n=40$  chromosomes (14m + 26sm, NF = 80) and 7 approved specimens  $2n=42$  chromosomes (22m + 20sm, NF = 84) thus characterizing as belonging to karyomorphs C and A, respectively. Thus, the three best (quality/quantity of metaphases) analyzed specimens were selected, with 2 individuals characterized by the karyomorph C (1 male and 1 female) and 1 individual of the karyomorph A (male). From the C-Banding, heterochromatic regions present in the pericentromeric region were evidenced in most chromosomes, regardless of the cytotype. FISH with 5S rDNA and 18S rDNA probes was performed in the 3 best individuals, and showed conversion between the diagnosed specimens. The absence of bitlomic marking in one of the chromosomes of pair 13, only in the female of karyomorph C, stands out, thus being able to indicate a polymorphism, regardless of sex. For classic chromosomal analyses: the information advanced in this study is similar to that approved in other literature. And reinforce the presence of cytotypes A and C in the region of Lake Itaipu.

Keywords: cytogenetic; *Hoplias*; "Thraira"; FISH.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Região gular de (A) <i>Hoplias curupira</i> (espécie do grupo <i>Hoplias lacerdae</i> ) e (B) <i>Hoplias</i> gr. <i>Malabaricus</i> .....	17
Tabela 1 – Características dos cariomorfos de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> descritos.....	18
Figura 2 - Ponto de coleta dos exemplares de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> .....	20
Figura 3 - (a) Participantes do projeto e (b) ponto de coleta.....	21
Figura 4 - Exemplar de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> .....	21
Figura 5 - Cariótipo submetido à coloração por Giemsa (a) e C bandado (b) de exemplar macho de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> pertencente ao cariomorfo A .....	26
Figura 6 - Cariótipo submetido à coloração por Giemsa (a) e C bandado (b) de exemplar macho de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> pertencente ao cariomorfo C .....	27
Figura 7 - Cariótipo de exemplares fêmea (a) e macho (b) do Cariomorfo C submetidos a Dupla-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde) .....	28
Figura 8 - Cariótipo de exemplar do Cariomorfo A submetido a Dupla-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde) .....	29

## LISTA DE SÍMBOLOS

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
Ba(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de bário
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ácido fórmico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
HCl	Ácido clorídrico
M	Molar
NOR	Nuclear Organizer Regions
rDNA	Ribossomal Deoxyribonucleic Acid
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	OBJETIVOS .....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REFERENCAL TEÓRICO.....	15
3.1	Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....	15
3.2	Erythrinidae .....	16
3.3	Gênero <i>Hoplías</i> .....	16
3.4	<i>Hoplías malabaricus</i> .....	17
4	METODOLOGIA .....	20
4.1	Coleta dos espécimes.....	20
4.2	Preparação de cromossomos mitóticos – tratamento “ <i>in vitro</i> ” .....	21
4.3	Preparo das lâminas .....	22
4.4	Análises cromossômicas .....	22
4.5	Determinação do padrão heterocromático .....	23
4.6	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente .....	23
5	RESULTADOS.....	26
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A região Neotropical é considerada única dentre outros diversos ecossistemas continentais terrestres, pois abriga alta diversidade de peixes continentais e de outros táxons como angiospermas, lepidópteros, coleópteros, mamíferos, aves, répteis, crustáceos decápodes, moluscos e insetos (REIS et al., 2016; ALBERT, 2020).

No que se refere aos peixes, Characiformes é uma das ordens com maior diversidade, com representantes em bacias hidrográficas da América do Sul, Central, África, e na maioria das bacias hidrográficas brasileiras (BAUMGARTNER et al., 2012; OTA, et al. 2018). A ordem é caracterizada pela presença de peixes de escamas cicloides e nadadeiras pélvicas abdominais (BAUMGARTNER et al., 2012).

Dentre os gêneros alocados em Characiformes, podemos destacar *Hoplias* pela sua ampla distribuição geográfica, abundância e complexidade taxonômica. Dentre as espécies pertencentes à *Hoplias*, a mais estudada citogeneticamente é *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (BERTOLLO, 2000). Segundo Scavonne et al. (1994) e Bertollo (1996) os dados citogenéticos suportam a ideia de que *Hoplias malabaricus* não corresponderia apenas a uma única unidade taxonômica, mas sim a um complexo de espécies, com grande diversificação cariotípica. Dentro desta diversificação, Bertollo (2000) afirma a ocorrência de 7 cariomorfos encontrados, denominados alfabeticamente do A ao G, com diferenças encontradas no número diploide para cada uma delas, além da ocorrência de sistema de cromossomos sexuais para alguns dos cariomorfos encontrados.

Até o presente momento já foram descritos para a bacia do alto rio Paraná os cariomorfos A ( $2n=42$  cromossomos, sem a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos), C ( $2n=40$  cromossomos, sem a ocorrência de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos) e D ( $2n=40$  para fêmeas e  $2n=39$  para machos, diferença oriunda da presença de sistema de cromossomos sexuais  $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$ ) (BERTOLLO et al., 1996; PAZZA; JUNIOR, 2003).

Considerando o exposto, aliado à inexistência de dados relacionados à caracterização cromossômica de exemplares do grupo *Hoplias malabaricus* na área de influência do lago Itaipu: município de Santa Helena, Paraná (Bacia do Alto Paraná), tal levantamento se faz necessário para uma maior compreensão da Biodiversidade ictiofaunística local. Adicionalmente, os dados obtidos podem contribuir para elucidar questões de ordem evolutiva e taxonômica inerentes ao grupo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Considerando a problemática descrita, este projeto teve como objetivo analisar cromossomicamente exemplares de *Hoplias aff. malabaricus* coletados em diferentes pontos no município de Santa Helena (PR), para definir quais cariomorfos encontram-se presentes.

### 2.2 Objetivos específicos

- Coletar exemplares do grupo *Hoplias malabaricus* de diferentes pontos do município de Santa Helena-PR;
- Determinar o número diploide ( $2n$ ) e número fundamental (NF) dos exemplares coletados;
- Determinar quais os cariomorfos das populações analisadas;
- Determinar características moleculares, utilizando da técnica de Hibridação *in situ*, das regiões de 5S rDNA e 18S rDNA.

### 3 REFERENCAL TEÓRICO

#### 3.1 Bacia Hidrográfica do Paraná 3

O Rio Paraná origina-se da confluência dos rios Parnaíba e Grande, correndo em território brasileiro até o Salto das Sete Quedas, onde faz fronteira entre o Brasil e o Paraguai, ponto onde o Rio Iguaçu desagua no Rio Paraná, na cidade de Foz do Iguaçu, seguindo seu leito entre o Paraguai e a Argentina (RIBEIRO, 2002). No trecho da fronteira entre Brasil e Paraguai, o Rio Paraná apresenta uma ampla área alagada devido ao represamento oriundo da construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu. Didaticamente, é dividida em três Bacias hidrográficas, denominadas BP1, BP2 e BP3 (PARANÁ, 2013).

A Bacia do Paraná 3 (BP3) está inserida na região oeste do Estado do Paraná e apresenta uma geografia que favorece a presença de uma vasta rede hidrográfica, orientada principalmente pelas águas do Rio Paraná e seus afluentes. Adicionalmente, possui uma área total de 7.979,40 km<sup>2</sup>, sendo cerca de 4% da área do estado. Os principais afluentes presentes nesta bacia são: o Rio São Francisco, que nasce em Cascavel, o Rio Guaçu, que nasce em Toledo, o Rio São Francisco Falso, que nasce em Céu Azul e o Rio Ocoí, que nasce em Matelândia, sendo que todos desaguam diretamente no Reservatório do Lago de Itaipu. A bacia conta com importantes unidades de conservação, como: o Parque Nacional de Ilha Grande, Parque Nacional do Iguaçu e a Área de Proteção Ambiental (APA) das Ilhas e Várzeas do Rio Paraná. Além, da unidade de proteção integral, a área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) da Cabeça-do-Cachorro (PARANÁ, 2013; ROCHA & BADE, 2018)

No leito do Rio Paraná foi construída a maior usina hidrelétrica do Brasil, conhecida como usina de Itaipu, teve sua construção concluída em 1982, inundando uma área de 1350km<sup>2</sup>. Foram afetados na época, oito municípios do lado brasileiro: Guaíra, Terra Roxa, Marechal Cândido Rondon, Santa Helena (local do presente estudo), Matelândia, Medianeira, São Miguel do Iguaçu e Foz do Iguaçu (OLIVEIRA; GOULART; MINTE-VERA, 2004). O represamento alterou todo o nível de base do Rio Paraná, bem como promoveu alterações nos fluxos hídricos e todo o setor que envolve a BP3 (ROCHA; BADE, 2018), causando alterações significativas na ictiofauna local.

### 3.2 Erythrinidae

Dentre as diversas famílias de peixes neotropicais de água continental, Erythrinidae destaca-se por seu endemismo na América do Sul e Central e possui uma ampla distribuição nas bacias brasileiras (BERTOLLO, 1978; VITORINO, 2007). A família compreende apenas três gêneros: *Erythrinus* Scopoli (1977), *Hoplerythrinus* Gill (1895) e *Hoplias* Gill (1903) (AZEVEDO; GOMES, 1943; OYAKAWA, 2003)”, sendo que as espécies de *Hoplerythrinus* são popularmente conhecidas como “jejus”, e as pertencentes à *Hoplias* como “traíras” e “trairões”.

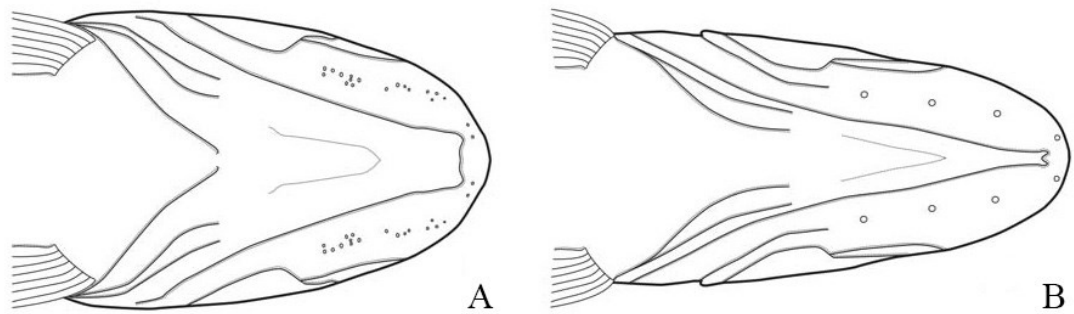
Em sua maioria, os representantes de Erythrinidae possuem um corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada, nadadeira dorsal contendo de 8 a 15 raios e nadadeira anal de 10 a 11 raios, nadadeira adiposa ausente, além da presença de diversos dentes caniniformes, fato que auxilia nos hábitos sedentários de caça por emboscada (BERTOLLO et al., 2000; OYAKAWA, 2003).

### 3.3 Gênero *Hoplias*

Segundo Oyakawa (1998) e Britski et al. (1988), *Hoplias* diferencia-se de outros gêneros de Chariciformes por algumas características derivadas, como por exemplo a presença de interdigitações que promovem ligação do vômer com paraesfenoide e a presença de caninos nas regiões maxilar e em porções anteriores e posteriores da região dentária.

O gênero *Hoplias* apresenta uma grande distribuição geográfica, contém diversas espécies descritas na América Latina e possui dois grandes grupos: *Hoplias lacerdae* (popularmente conhecidos como “trairões”) e *Hoplias malabaricus* (popularmente conhecidas como “traíras”) (OYAKAWA, 2003; DE OLIVEIRA, 2015; ROSSO et al., 2018). Um dos principais caracteres morfológicos para distinção entre espécimes dos dois grupos encontra-se na região gular, na qual as bordas dos dentários são convergentes no grupo *H. malabaricus*, encontrando-se na região anterior (formando uma estrutura em “V”), enquanto no grupo *H. lacerdae* são paralelos (Fig. 1).

**Figura 2 – Região gular de (A) *Hoplias curupira* (espécie do grupo *Hoplias lacerdae*) e (B) *Hoplias gr. malabaricus*.**



**Fonte: O.T. Oyakawa & M. T. Mattox (2009)**

Análises cromossômicas revelam significativas diferenças no número diploide entre espécies dos dois grupos, sendo que em *Hoplias gr. malabaricus* há uma variação de  $2n=39$  a  $2n=42$  (BERTOLLO et al., 2000), e em *Hoplias gr. lacerdae*, o número diploide encontrado é de  $2n=50$  cromossomos (MORELLI et al., 2007; BLANCO et al., 2011).

### **3.4 *Hoplias malabaricus***

O grupo *Hoplias malabaricus* vem sendo estudado desde o século XX, quando foram iniciados os estudos do grupo por Bertollo (1978). Até o presente momento, distintas populações de *Hoplias gr. malabaricus* já foram analisadas cromossomicamente, abrangendo diferentes regiões da América do Sul, desde a Argentina até o Suriname, regiões litorâneas do Norte e Sul do Brasil, Amazônia, Mato Grosso (Pantanal) e Rondônia (BERTOLLO et al., 2000).

Segundo Bertollo et al. (2000), *Hoplias malabaricus* trata-se de um complexo de espécies, no qual até o presente momento sete cariomorfos (denominados do cariomorfo A ao cariomorfo G) são identificados, baseando-se em dados cromossômicos como número diploide, morfologia e sistemas de cromossomos sexuais.

Considerando tais particularidades, os cariomorfos foram originalmente divididos em dois grandes grupos, sendo o Grupo I composto pelos cariomorfos A, B, C e D; e o Grupo II composto pelos cariomorfos E, F e G (BERTOLLO et al., 2000). Este agrupamento indica que as macroestruturas cariotípicas, os sistemas de cromossomos sexuais, assim como a ocorrência de cromossomos atípicos sejam



mais indicativos para o estabelecimento de relações evolutivas entre os cariomorfos do que as similaridades no número diploide (VICARI et al., 2003).

Os cariomorfos estão distribuídos em diversas bacias brasileiras, sendo:

**Tabela 1 – Características dos cariomorfos de *Hoplias aff. malabaricus* descritos**

<b>Grupo</b>	<b>Cariomorfo</b>	<b>Localização</b>	<b>Características cromossômicas</b>
<b>I</b>	Cariomorfo A	Localizado do nordeste ao sudeste brasileiro, e ao norte da Argentina.	2n=42 cromossomos Sem Sistema sexual (BERTOLLO et al., 1979; BORN; BERTOLLO 2000).
	Cariomorfo B	Distribuição restrita ao estado de Minas Gerais.	2n=42 cromossomos Com Sistema sexual (XX/XY) (BERTOLLO et al., 1979; BORN; BERTOLLO 2000).
	Cariomorfo C	Ampla distribuição (do norte do Brasil ao norte da Argentina)	2n=40 cromossomos Sem Sistema sexual (LOPES; FENOCCHIO, 1994; JORGE, 1995; BERTOLLO et al., 1997a; LOPES et al., 1998; BERTOLLO et al., 2000);
	Cariomorfo D	Distribuição limitada para a bacia hidrográfica do Alto Rio Paraná	2n=39 (♂) 40 (♀) cromossomos Com sistema sexual (X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y ♂) (X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> ♀) (BERTOLLO et al., 1983; DERGAM; BERTOLLO, 1990; SCAVONE et al., 1994; DERGAM, 1996; BERTOLLO et al., 1997b; BERTOLLO et al., 2000)
<b>II</b>	Cariomorfo E	Restrito ao Rio Trombetas (Pará – BR)	2n=42 cromossomos Sem Sistema sexual e difere do cariomorfo A pela morfologia cromossômica (BERTOLLO et al., 2000).

	Cariomorfo F	Ocorre do Suriname ao sudoeste brasileiro	2n=40 cromossomos Sem Sistema sexual e difere do cariomorfo C pela morfologia cromossômica (DERGAM; BERTOLLO, 1990; BERTOLLO et al., 1997a; BERTOLLO, et al., 2000).
	Cariomorfo G	Distribuição restrita à bacias amazônicas	2n=40 (♂) 41 (♀) cromossomos. Com Sistema sexual (XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub> ♂) (XX ♀)

Fonte: Autoria própria (2022).

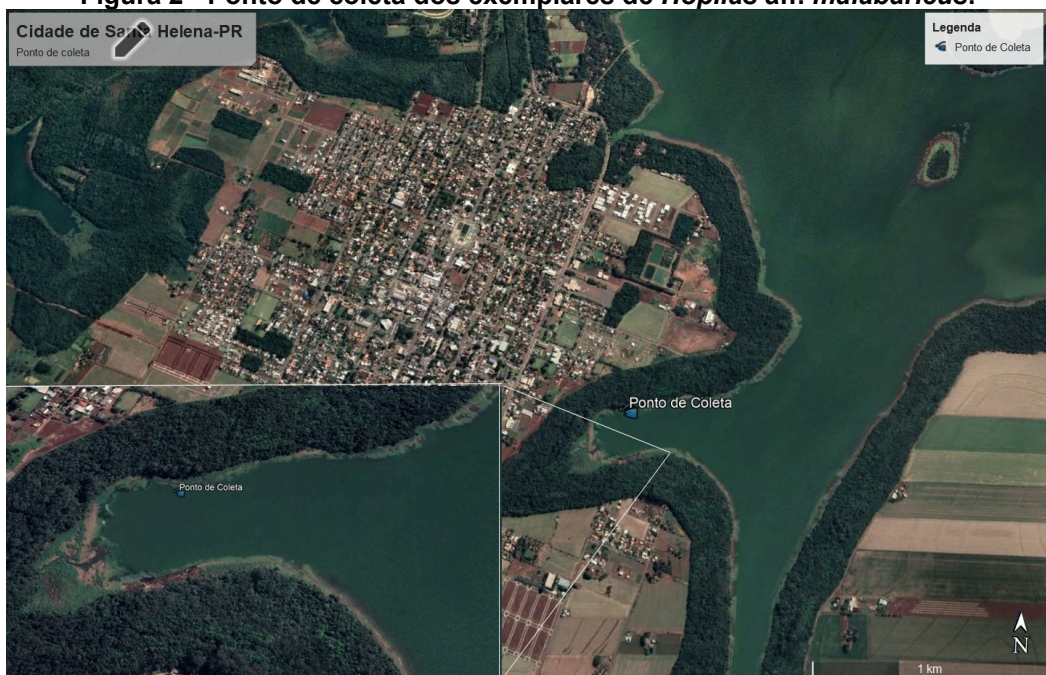
Para a bacia do Alto Rio Paraná, Pazza et al. (2003) analisaram trinta e três exemplares de *Hoplias malabaricus* coletados na região de Porto Rico (PR) e determinaram a presença de 3 diferentes formas, sendo o cariomorfo A (2n=42 cromossomos - 24m e 18sm - sem a presença de sistema de cromossomos sexuais) o mais raro (sendo evidenciado em apenas 3 espécimes) e o cariomorfo C (2n=40 cromossomos - 26m e 14sm - sem um sistema de cromossomos sexuais) o mais abundante para a região. Adicionalmente, foram identificados exemplares do cariomorfo D 2n=40 cromossomos (24m e 16sm) para fêmeas e 2n=39 cromossomos (24m, dos quais dois não apresentam homólogos, e 14sm, dos quais um não possui homólogo) para machos (expondo um sistema de cromossomos sexuais múltiplos com X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub> para fêmeas e X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y para machos), em frequência intermediária.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta dos espécimes

Foram coletados 16 espécimes, sendo, 11 machos e 2 fêmeas (3 inconclusivas), identificados morfológicamente como *Hoplias aff. malabaricus*, provenientes de um braço do Lago de Itaipu, no município de Santa Helena, Paraná (24°51'43.57"S 54°19'25.95"O) (Fig.1), com auxílio varas de pesca e tarrafas (Fig. 2) (Licença permanente SISBIO 38532).

**Figura 2 - Ponto de coleta dos exemplares de *Hoplias aff. malabaricus*.**



**Fonte: Autoria própria, plataforma Google Earth (2022)**

**Figura 3 – (a) Participantes do projeto e (b) ponto de coleta.**



**Fonte: Autoria própria (2020)**

Após a coleta, os exemplares foram levados vivos, sob condições adequadas de temperatura e oxigenação, para o Laboratório de Ictiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Santa Helena*, onde foram mantidos em aquários aerados (Figs. 3 e 4). Posteriormente, os exemplares foram eutanasiados por overdose de óleo de cravo na concentração de 100mg/L para retirada dos tecidos para as análises citogenéticas, em conformidade com o Comitê de Ética na Utilização de Animais da UTFPR (protocolo CEUA 2022-10).

**Figura 4– Exemplar de *Hoplias aff. malabaricus***



**Fonte: Autoria própria (2020)**

#### **4.2 Preparação de cromossomos mitóticos – tratamento “*in vitro*”**

Para a obtenção de cromossomos mitóticos e posteriormente preparação das lâminas, foi utilizada a técnica adaptada por Foresti et al (1993), sendo a obtenção de

metáfases mitóticas provenientes de células presentes no rim cefálico (rim anterior) dos animais, visto que tal órgão possui função hematopoiética.

O material foi suspenso em 10 mL de meio de cultura RPMI, para assim ser dissociado. Posteriormente, a suspensão celular obtida, foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Na sequência, foram pingadas de 1 a 2 gotas de solução de Colchicina 0,016%, associando bem os materiais. Assim, o material pôde ser levado à estufa em 36°C, sendo mantido em um tempo médio de 30 minutos e em consequência, levado para a centrifuga, por 10 minutos a 1100rpm.

Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante sendo adicionado 10 ml de KCl 0,075 M, ressuspensando o material com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após isso, o material foi levado novamente à estufa a 36°C, tempo médio de 30 minutos. Em sequência, 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético; 3:1) foram adicionadas com o material, formando uma mistura homogênea. Sendo centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. Com o sobrenadante desprezado, foram adicionadas 10 ml de fixador, formando novamente uma mistura homogênea, e em seguida levado à centrifuga por 10 minutos a 1100 rpm. Essa etapa foi então repetida por mais duas vezes. O material fixado foi acondicionado em tubos de microcentrifuga tipo “Eppendorf” e armazenados em freezer, para posterior análise.

#### **4.3 Preparo das lâminas**

Para o preparo das lâminas, gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina limpa e aquecida à 50°C~60°C, aproximadamente, deixando-a secar ao ar. Após a secagem ao ar, seguiu com a coloração do material com Giemsa 5% e tampão fosfato (ph 6,8), aplicando para que preencha a lâmina por completo, permanecendo de 5 a 8 minutos, para então, ser lavada em água corrente, eliminando todo acúmulo do corante (FORESTI et al., 1993).

#### **4.4 Análises cromossômicas**

As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com óleo de imersão no microscópio óptico, em objetiva de 100 vezes. As melhores metáfases foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX53 acoplado com câmera digital QColor5M. A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan et al. (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos serão considerados com 2 braços cromossômicos.

#### **4.5 Determinação do padrão heterocromático**

Para a determinação do padrão heterocromático foi utilizada a técnica de Bandamento C de Sumner (1972), com pequena alteração na etapa final de coloração. De forma que, as lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2 N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5 % a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Posteriormente, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2 N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60 °C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com Iodeto de Propídio (0,7 µL de Iodeto de Propídio para 20 µL de *antifading*), seguindo modificação proposta por Lui et al. (2012).

#### **4.6 Hibridização *in situ* Fluorescente**

A técnica foi realizada de acordo com Pinkel et al., (1986), adaptadas por Margarido et al., (2008), utilizando sondas de DNAr 5S e 18S.

##### **4.6.1. Preparação da sonda:**

Foram adicionadas a um tubo Eppendorf 1 µg de DNA sonda, H<sub>2</sub>O mili-Q autoclavada para completar os 16 µL de solução e 4 µL de mix de reação (Kit). Realizou, posteriormente, a homogeneização da solução com uma micropipeta e levadas a banho-maria (isopor) por 1 e 1/2 horas a 15°C. Foi adicionado 1 µL EDTA 0,5 M, pH = 8,0, e elevou a temperatura a 65°C por 10 minutos para finalizar a reação. O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% gelado (2 vezes o volume) overnight. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Após isso, o material foi lavado com

50 µL de etanol 70% gelado, centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante, e seco em estufa a 37°C;

#### 4.6.2 Preparação das lâminas:

As lâminas foram encubadas em 88 µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) sob lamínula, a 37°C por uma hora em câmara úmida com água 2 vezes por 5 minutos em 2xSSC com agitação; sendo incubadas em 2xSSC a 60°C por 45 minutos, posteriormente. Com isso, as lâminas foram desidratadas em série de 70% etanol e 100% por 5 minutos a temperatura ambiente; e posteriormente secas ao ar. Em seguida, foram desnaturadas em 0,05N NaOH/2xSSC por 3 minutos e desidratadas em série de etanol 70% e 100% por 5 minutos cada, a temperatura ambiente; e deixadas para secar ao ar.

#### 4.6.3 Hibridização:

Para confecção do mix de hibridização foram adicionadas ao tubo:

- 6 µL da sonda 18S rDNA;
- 6 µL sonda 5S rDNA;
- 6 µL de 20xSSC;
- 30 µL de formamida;
- e 12 µL de sulfato dextrano 50%, por lamina.

Posteriormente, o mix foi colocado em banho-maria a 100°C por 10 minutos para abertura das fitas e transferido imediatamente no gelo para estabilização. Com isso, adicionou-se 58 µL de solução de hibridização em lamínula para cada lâmina e em seguida arrumadas, as lâminas, em câmara úmida e incubadas a 37°C por 12 horas (overnight). A câmara úmida foi preparada com H<sub>2</sub>O.

#### 4.6.4 Detecção e amplificação do sinal:

As lâminas foram lavadas em 1xSSC por 5 minutos a 37°C (sob agitação) e posteriormente lavadas por 2 vezes em Tween 0,05%/4xSSC por 5 minutos cada (sob agitação). Em seguida, estas foram incubadas em tampão 5% NFDm/4xSSC em temperatura ambiente por 15 minutos e lavadas 2 vezes por 5 minutos com Tween 0,05%/4xSSC em temperatura ambiente (sob agitação). Sendo incubadas com 88 µL de Antidigoxigenina-Rhodamine+avidin-FITC (0,5 µL de Rhodamine + 0,4 µL de FITC

+ 90  $\mu$ L 5% NFD/4xSSC) por lâmina, durante 60 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente.

Para assim, serem lavadas em tampão 5% NFD/4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação), 2 vezes em Tween 0,05%/4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação) e 1 vez em 4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação). Ao final, deixou-se em 1xSSC por 5 minutos, e secar ao ar.

#### 4.6.5 Montagem das lâminas

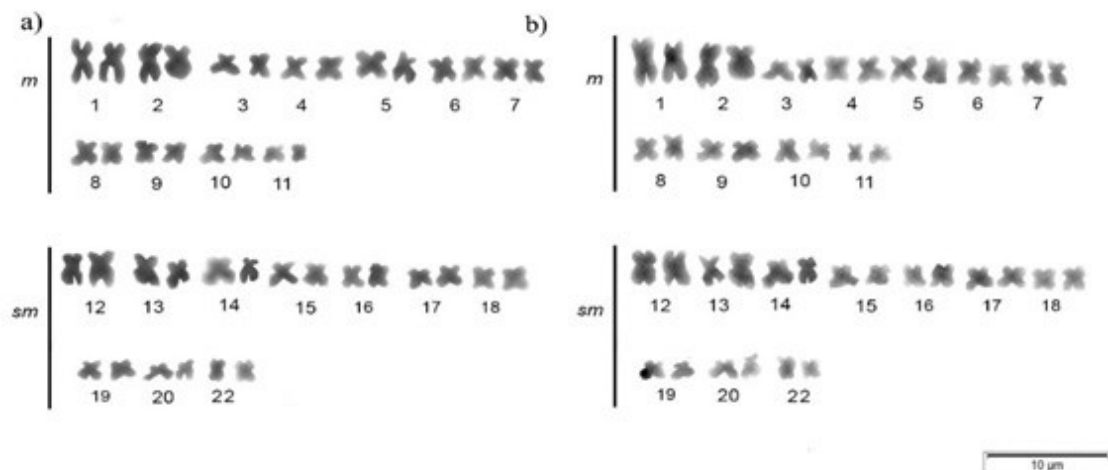
Foram misturados 200  $\mu$ L de antifading mais 1  $\mu$ L de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2 mg/mL), e em seguida foi adicionado 25  $\mu$ L da mistura. Posteriormente, a lâmina foi coberta com lamínula e guardada em local protegido da luz, para posteriormente serem analisadas em microscopia de fluorescência.



## 5 RESULTADOS

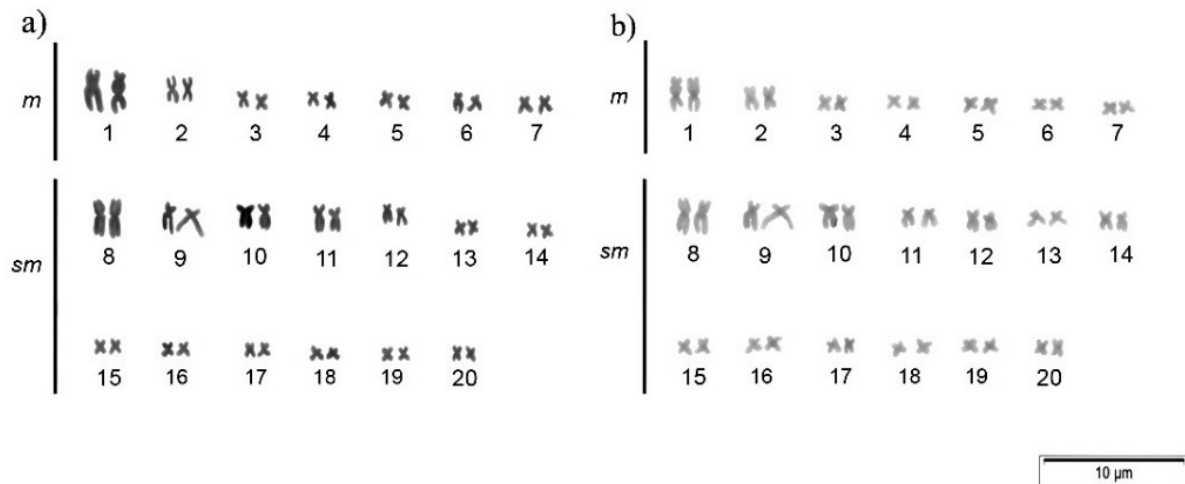
Dentre os 16 exemplares de *Hoplias aff. malabaricus* analisados no presente trabalho, 13 apresentaram resultados satisfatórios, sendo que 07 exemplares (todos machos) apresentaram  $2n=42$  cromossomos ( $22m + 20sm$ ,  $NF = 84$ ) e 6 exemplares (04 machos e 02 fêmeas) apresentaram  $2n=40$  ( $14m + 26sm$ ,  $NF = 80$ ) (Figs. 5 e 6). Considerando a classificação proposta para os cariomorfos de *H. malabaricus*, podemos concluir que os indivíduos com número diploide de 42 cromossomos pertencem ao cariomorfo A e os indivíduos com 40 cromossomos pertencem ao cariomorfo C.

**Figura 5 - Cariótipo submetido à coloração por Giemsa (a) e C bandado (b) de exemplar macho de *Hoplias aff. malabaricus* pertencente ao cariomorfo A.**



Fonte: Autoria Própria (2020)

**Figura 6 - Cariótipo submetido à coloração por Giemsa (a) e C bandado (b) de exemplar macho de *Hoplias aff. malabaricus* pertencente ao cariomorfo C.**



**Fonte: Autoria Própria (2020)**

O Bandamento C evidenciou regiões heterocromáticas presentes na região pericentroméricas na maioria dos cromossomos dos indivíduos analisados, independentemente de pertencer ao cariomorfo A ou C. É importante ressaltar que existem pequenas exceções, como marcações em braços longos ou por toda a extensão do cromossomo (Fig. 5b; Fig. 6b). Este padrão de blocos heterocromáticos preferencialmente alocados na região centromérica, com algumas marcações na porção intersticial parece ser um padrão para *Hoplias*, sendo encontrado em populações analisadas de outras localidades (BERTOLLO, 2000; BLANCO, 2010; MARGARIDO et al., 2017)

Os resultados obtidos nas técnicas de Bandamento-C, como a presença de regiões heterocromáticas em regiões pericentroméricas, e a presença de múltiplas NORs, em ambos os cariomorfos, assemelham-se aos encontrados na literatura. E o presente estudo resalta a presença dos cariomorfos A e C em simpatria na região de influência do lago, algo que até o presente momento ainda não havia sido identificado.

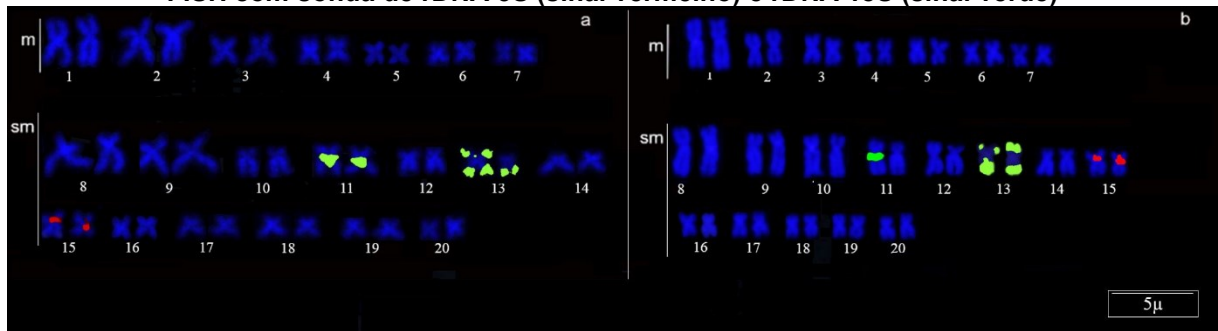
A hibridização *in situ* fluorescente com sonda de rDNA18S evidenciou marcações em 2 pares cromossômicos para o exemplar macho do cariomorfo C, sendo o par 11 em região pericentromérica e o par 13 com marcação bitelomérica. Entretanto, para o macho do cariomorfo C a hibridização evidenciou as mesmas marcações do macho, excetuando que para o par 11, somente um cromossomo apresentou marcação (Fig. 7). Esta diferença pode ser um artefato de técnica pelo

fato de somente um indivíduo de cada sexo ter sido submetido à FISH ou pode indicar um polimorfismo, independente do sexo. Mais estudos serão necessários para confirmação dessa hipótese.

Para o cariomorfo A a FISH com sonda de rDNA 18S identificou marcações em cromossomos submetacêntricos terminais nos braços longos dos pares cromossômicos 13, 16 e 20, além de marcação pericentromérica nos pares cromossômicos 18 e 21 (Fig. 8).

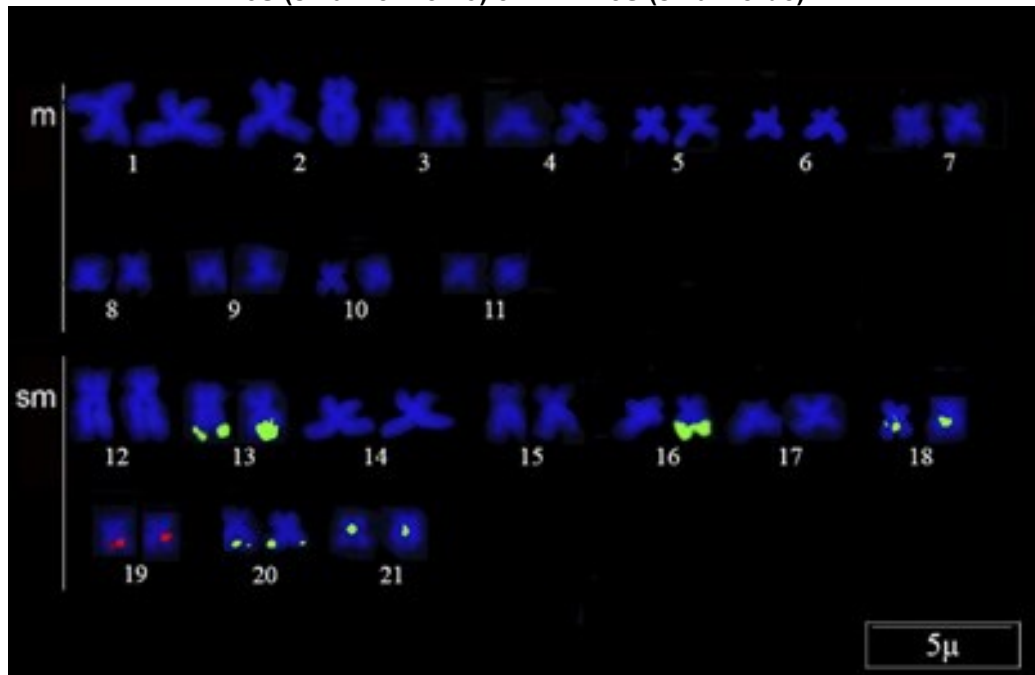
A FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou marcações na posição pericentromérica do par 15 os espécimes do cariomorfo C (Fig.7) e marcações proximais no braço longo do par cromossômico 19 para o cariomorfo A (Fig.8).

**Figura 7 - Cariótipo de exemplares fêmea (a) e macho (b) do Cariomorfo C submetidos a Dupla-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde)**



Fonte: Aatoria própria (2022)

**Figura 8 - Cariótipo de exemplar do Cariomorfo A submetido a Dupla-FISH com sonda de rDNA 5S (sinal vermelho) e rDNA 18S (sinal verde)**



Fonte: Autoria própria (2022)

As características citogenéticas do cariomorfo A, da população estudada em relação ao padrão de rDNA 18S, foram significativamente divergentes quando comparadas com outras populações do Alto Paraná. Por exemplo, Grassi et al. (2017) ao estudarem uma população de *H. malabaricus* do Rio Ctalamochita (Córdoba-ARG), pertencentes ao cariomorfo A, encontraram marcações de 18S na região pericentromérica no par 12 e terminais nos braços longos para o par 20.

Para a marcação em rDNA 5S o encontrado no presente trabalhos foi distinto ao descrito na literatura para o cariomorfo A, estando em região pericentromérica, no entanto, em pares distintos. Como descrito por Margarido et al. (2014), que encontraram marcações 5S nos pares 8 e 14. Estudos anteriores afirmam que este marcador varia em número de sítios em populações do cariomorfo A, com pequeno par metacêntrico intersticial sendo extremamente conservado (BLANCO et al. 2010). No nosso trabalho, encontramos o rDNA 5S presente em um par submetacêntrico pequeno. Essa diferença na morfologia pode ser resultado de uma inversão pericêntrica.

Tanto para as marcações rDNA 5S quanto rDNA 18S, do cariomorfo C, não foram encontrados trabalhos prévios para o Alto Paraná. Ao comparar o mapeamento cromossômico de 5S e 18S rDNA, de Cioffi (2009), na população de *H. malabaricus*

do Rio Bento Gomes (Poconé-MT), foram evidenciadas diferenças consideráveis. Sendo, para 5S, as marcações intersticiais no 2º par metacêntrico e marcação proximal no braço curto no 13º par submetacêntrico. Já para marcações 18S, os pares 5, 13, 15 e 19 foram marcados em região terminal e no par 11 em região pericentromérica.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo ressalta a presença dos cariomorfos A e C do grupo *Hoplias malabaricus*, em simpatria, na região de influência do lago de Itaipu, município de Santa Helena, Estado do Paraná, Brasil. Os resultados obtidos pelas técnicas de Bandeamento-C, como a presença de regiões heterocromáticas em regiões pericentroméricas em ambos os cariomorfos, assemelham-se aos encontrados na literatura para os respectivos cariomorfos.

Em relação à Hidização *in situ* fluorescente - FISH, os resultados encontrados caracterizaram a natureza cromossômica molecular dos sítios de DNA ribossomal 5S e 18S para indivíduos presentes no Alto Paraná, área de influência do Lago Itaipu (SH-PR); no entanto, não podemos considerar um padrão para todas as populações da região, pois o N amostral foi relativamente baixo, com poucas fêmeas analisadas para comparação intersexual.

Entendemos que a caracterização dos cariomorfos presentes em diversas bacias podem auxiliar na compreensão da diversidade presente no grupo, e com isso, ressaltar a importância da preservação ambiental, bem como a preservação dos ecossistemas em geral. Neste sentido, o presente estudo pode ser considerado precursor para estudos posteriores na região do lago de Itaipu, no município de Santa Helena.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT, J. S., TAGLIACOLLO, V. A., & DAGOSTA, F. **Diversification of Neotropical Freshwater Fishes**. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 51, n.1, 2020.
- BAUMGARTNER, G., et al. **Peixes do baixo rio Iguaçú**. Maringá: Eduem. Characiformes. p. 57-100, 2012.
- BERTOLLO, L. A. C. **The Nucleolar Organizer Regions of Erythrinidae Fish: An uncommon situation in the genus *Hoplias***. Cytologia, v. 61, n.1, p. 75-81, 1996.
- BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA FILHO, O. **A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*: Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes. Rev Fish Biol Fisheries cytotaxonomic considerations. Chromosome Res 8, p. 603–613, 2000.**
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA FILHO, O. **Cytotaxonomic considerations on the *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae)**. Brazilian Journal of Genetics, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO O, F.M.S. **Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n a 40 chromosomes**. Brazil J Genet 20: p. 237-242, 1997a.
- BERTOLLO, L.A.C.; FONTES, M.S.; FENOCCHIO, A.S.; CANO, J. **The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus***. I. G-, C- and chromosome replication banding. Chromosome Ed 5:p. 493-499, 1997b.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. **Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae)**. Cytologia 48: p. 1-12, 1983.
- BLANCO, D. R.; LUI, R. L.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. **Comparative Cytogenetics of Giant Trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal Characteristics of Minor and Major Ribosomal DNA and Cross-Species Repetitive Centromeric Sequences Mapping Differ among Morphologically Identical Karyotypes**. Cytogenetic and Genome Research, v. 132, p. 71-78, 2011.
- BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. **An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome**. Chromosome. Res 8: p. 111-118, 2000.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. 3ª ed. Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações/ CODEVASP, Divisão de Piscicultura e Pesca, Brasília, Brasil, p. 115, 1988.
- CIOFFI, M.B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L.A.C. **Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus***. BMC Genetics (Online), v. 10, p. 34, 2009.

DE OLIVEIRA, E. A. **Evolução cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes)**. Citogenética comparativa entre espécies do gênero *Hoplias*. São Carlos : UFSCar, 2015. 58 f. 2015.

DERGAM, J.A. **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex**. PhD thesis. Colorado State University, USA, 1996.

DERGAM, J.A.; BERTOLLO, L.A.C. **Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Parana basins, Brazil**. Brazil J Genet. 13: p. 755-766, 1990.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, L.A.A.T. **Method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine**. Experientia 49, 810–813. 1993. <https://doi.org/10.1007/BF01923555>.

GRASSI, D.J. et al. **Cytogenetic characterization of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) from the Ctalamochita River (Córdoba, Argentina): first evidence for southern most populations of this species complex and comments on its biogeography**. Comp Cytogenet; 11(1): 15-28. 2017.

GRIFFITHS, R. I. et al. **Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition**. Applied and environmental microbiology vol. 66,12: 5488-91. 2000.

HOWELL, W.; BLACK, D.A. **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method**. Experientia. 36. 1014-5. 1980.

ICMBio. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. V.6.Peixes. ISBN: 978-85-61842-79-6. Acesso em: 25/05/2022.**

JORGE, L. C. **Estudos citogenéticos comparativos de algumas espécies de peixes da região de Corrientes - Argentina com as do Alto Paraná**. MSc dissertation. Universidade Federal de São Carlos, Brazil, 1995.

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

LOPES, P. A.; FENOCCHIO, A. S. **Confirmations of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes)**. Cytobios 80: p. 217 – 221, 1994.

LOPES, P.A.; ALBERTI, A.J.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S. **Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey river (Province of Corrientes, Argentina)**. Copeia, p. 485-487, 1998.

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MOREIRA-FILHO, O. MARGARIDO, V.P. **Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique**. Biotech Histochem. 2012 Oct;87(7):433-8. 2012.



- MARGARIDO, V. et al. **Basic cytogenetics and physical mapping of 5S and 18S ribosomal genes in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Characiformes, Erythrinidae) from isolated natural lagoons: a conserved karyomorph along the Iguaçú river basin.** *Comparative Cytogenetics*, 8(3), 211–222. 2014.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P.M. **Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes).** *Chromosome Res* 7:363–367. 1999.
- MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. H.; OYAKAWA, O. T.; LIMA, F. T.; CASTRO, R. M. C. & WEITZMAN, M. J. **Peixes de Água Doce da Mata Atlântica.** Museu de Zoologia -Universidade de São Paulo. 408p. 2007.
- MORELLI, S.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. **Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group: a particular pathway concerning the other Erythrinidae fish.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, p. 897- 903, 2007.
- OLIVEIRA, E.F.; GOULART, E.; MINTE-VERA, C.V. **Diversidade de peixes ao longo de gradientes espaciais no reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil.** *Braz. J. Biol.* v. 64, n. 3, p. 447-458, 2004.
- OTA, R. R., DEPRÁ, G. de C., GRAÇA, W. J. da, & PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated.** *Neotropical Ichthyology*, 16(2). 2018.
- OYAKAWA, O. T. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo lacerdae) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae).** Unpublished MS.c. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 114, 1990.
- OYAKAWA, O.T. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America: Erythrinidae (Trahiras).** p. 238–240. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. 2003
- OYAKAWA, O.T. **Relações filogenéticas das famílias Pyrrhulinidae, Lebiasinidae e Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes).** 1998. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998. Acesso em: 17 nov. 2022.
- OYAKAWA, O.T.; MATTOX, G.M.T. **Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species.** *Neotropical Ichthyology*, 7(2):117-140, 2009.
- PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA PARANÁ. **Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica.** 2ª ed. p. 112–138, 2013.
- PAZZA, R.; JULIO, J.H.F. **Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the Upper Paraná River floodplain (Brazil).** *Cytologia*, v. 68 n. 2 , p. 159-163, 2003.
- PORTARIA MMA Nº 445. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2014.
- REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M., PETRY, P.; ROCHA, L. A. **Fish biodiversity and conservation in South America.** *Journal of Fish Biology*, v. 89, n. 1, 12–47, 2016.

RIBEIRO, M.F.B. **Memórias do concreto**: vozes na construção de Itaipu. Cascavel: Edunioeste, 2002.

ROCHA, A. S.; BADE, M.R. **Geografia da bacia hidrográfica do Paraná 3: fragilidades e potencialidades socioambientais**. – Jundiaí, SP: Ed. In House, p. 314, 2018.

ROSA, R. S.; et al. **Os Peixes Brasileiros Ameaçados de extinção**. PEIXES. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. V.2. Disponível em:<<https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumell/peixes.pdf>>. Acesso em: 25/05/2022.

ROSSO, J.; CASTRO, M. G.; BOGAN, S.; CARDOSO, Y.; MABRAGAÑA, E.; DELPIANI, M.; DIAZ, J. A. **Integrative taxonomy reveals a new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Teleostei: Erythrinidae)**. Ichthyological Exploration of Freshwaters. 28. 10.23788/IEF-1076. 2018.

SCAVONE, M. D. P.; BERTOLLO, L.A.C.; CAVALLINI, M. M. **Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae)**. Cytobios 80: p. 223-227, 1994.

SUMNER, A.T. **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin**. Experimental Cell Research, Volume 75, Issue 1, Pgs 304-306, ISSN 0014-4827. 1972.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. **Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations**. Cytogenetic and Genome Research, Suíça, v. 101, n.1, p. 24-28, 2003.

VITORINO, C. A.; et al. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias malabaricus* (Traira) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jejus) do médio Araguaia**. Brasil, nais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

VAN DER LAAN, R.; ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R. **Family-group names of Recent fishes**. Zootaxa Monograph 3882 (1), 1-230. 2021.