

MARIANE ALVES BRITO PINTO

**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES DOS CLADOS *Astyanax* E
PROBOLODINI (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) EM BACIAS COSTEIRAS
DO LESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos

Coorientadora: Natália Martins Travenzoli

**VIÇOSA-MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P659d
2019 Pinto, Mariane Alves Brito, 1989-
Descrição cariotípica de espécies dos clados *Astyanax* e
Probolodini (Characiformes, Characidae) nas bacias costeiras do
leste brasileiro / Mariane Alves Brito Pinto. – Viçosa, MG, 2019.
32 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 30-32.

1. DNA repetitivo. 2. Citogenética. 3. *Osteichthyes*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

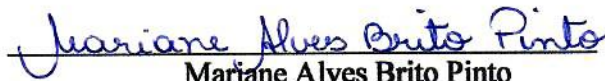
MARIANE ALVES BRITO PINTO

**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES DOS CLADOS *Astyanax* E
PROBOLODINI (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) EM BACIAS COSTEIRAS
DO LESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal
de Viçosa como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 10 de setembro de 2019.

Assentimento:


Mariane Alves Brito Pinto
Autora


Jorge Abdala Dergam dos Santos
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Agradeço a minha mãe que me guiou e me amparou em todas as jornadas da minha vida e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Saulo e Marília pelo apoio, Saulo por cuidar com tanto amor das minhas filhas (dogs) enquanto estive fora e Marília pelas palavras serenas nos dias de angústia.

Ao Jorge, por me acolher com tanto carinho e me proporcionar a realização de um sonho!

À minha Coorientadora, Natália, por me transmitir tanta calma e afeto e por acreditar que eu conseguiria vencer essa jornada.

Ao professor Sergio da Mata por me dar a Jezebel, a ratinha mais manhosa, que existe, e que trouxe muita alegria para os meus dias.

Aos meus colegas do Beagle, obrigada por tornar meus dias de trabalho mais divertidos. Em especial a Dani que se tornou uma grande amiga e que me acompanhou em momentos dentro e fora no laboratório. E ou meu “melhor amigo de infância” Victor pela companhia nas noites de trabalho, nos jantares no RU e pelas infinitas horas esperando o ônibus.

À Simone, a melhor profissional do Photoshop! Obrigada por virar tantos cromossomos, por todo o apoio, carinho e pela companhia.

À Priscila pela identificação dos peixes e por sempre arrumar um tempinho pra me explicar as, tão complexas, relações filogenéticas dos *Astyanax*. Que as deixa com os olhos brilhando!

Às minhas fiéis escudeiras, amigas e terapeutas Ingrid Thialy, Daiana e Juliana, por me confortarem nos momentos difíceis e compartilhar diversos momentos de alegria.

Às amigas que ganhei em cada república que passei (foram muitas), Daniela, Marina, Elizeth e em especial a Amanda que esteve comigo em tantos momentos divertidos, que compartilhou muitos dias de guloseimas para saciar a ansiedade e que sempre concluía meus projetos artesanais mirabolantes.

Às minhas “lindonas”, Emily, Manu, Marina e Naty, que mais do que um rostinho bonito, são lindas de alma! Obrigada por todas as sessões de “café terapia”, faltam palavras para agradecer todo o carinho e força que vocês me deram nessa jornada, sem vocês eu não teria vencido!

À Marina, que permeou por várias partes dos meus agradecimentos, afinal, foram muitos momentos juntas. Obrigada por todos os ensinamentos, pela companhia na hora do FISH, por sempre estar disponível pra me ajudar, mesmo que no domingo com jogos da copa do mundo ou nos poucos momentos de tempo livre. Que sempre me ouvia com paciência e por muitas vezes só respondia com letras garrafais “DRAMA!” Você é uma grande inspiração de profissional e ser humano. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal pela infraestrutura disponibilizada para a realização da pesquisa.

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

Agradeço a todos que fizeram parte dessa jornada, direto ou indiretamente.

Muito Obrigada!

RESUMO

PINTO, Mariane Alves Brito, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2019. **Descrição cariotípica de espécies dos Clados *Astyanax* e Probolodini (Characiformes, Characidae) em bacias costeiras do leste brasileiro.** Orientador: Jorge Abdala Dergam. Coorientadora: Natália Martins Travenzoli.

Characidae é a maior família da ordem Characiformes e apresenta uma elevada diversidade de formas e ampla distribuição, o que gera dúvidas quando ao monofiletismo de diversos gêneros pertencentes a essa família. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi analisar citogeneticamente representantes dos clados *Astyanax* e Probolodini das bacias costeiras do leste brasileiro. Foram utilizados coloração convencional (Giemsa) e marcadores citogenéticos moleculares (GA₁₅ e Ca₁₅) nas espécies *Astyanax* aff. *fasciatus*, *Astyanax giton*, *Astyanax lacustris*, *Deuterodon pedri* e *Astyanax* sp. 2. Todos os indivíduos analisados de *A.* aff. *fasciatus* apresentaram $2n = 48$ cromossomos, com fórmula cariotípica de $8m+18sm+18st+4a$. Para as demais espécies, o número diploide foi semelhante a $2n = 50$ cromossomos, sendo observadas as seguintes fórmulas cariotípicas: *A. giton* $6m+12mt+10st+20a$; *A. lacustris* $6m+20sm+18st+6a$; *D. pedri* $12m+12sm+20st+6a$; e *Astyanax* sp. 2 $6m+14mt+14st+16a$. Quanto ao padrão de hibridização das sondas GA₁₅ e Ca₁₅, essas foram encontradas amplamente distribuídas por todos os cromossomos do cariótipo das espécies analisadas, com um acúmulo preferencial nas regiões terminais e pericentroméricas, apesar de apresentarem perceptíveis diferenças no padrão de hibridização em cada espécie. Os resultados obtidos não permitiram a separação das espécies em clados distintos como proposto a separação de *Astyanax* e Probolodini. Portanto, se faz necessário o uso de sondas mais específicas para espécies do gênero *Astyanax*, assim como, um maior número de espécies analisadas concomitantemente, para que os dados citogenéticos sejam mais uma ferramenta que valide esses clados.

Palavras-chave: DNA repetitivo. Citogenética. *Osteichthyes*

ABSTRACT

PINTO, Mariane Alves Brito, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2019. **Karyotypic description of species of *Astyanax* and Probolodini clades (Characiformes, Characidae) in Brazilian eastern coastal basins.** Adviser: Jorge Abdala Dergam. Co-adviser: Natália Martins Travenzoli.

Characidae is the largest family of the order Characiformes, and presents a high diversity of forms and wide distribution, which raises doubts regarding the monophyly of several genera belonging to this family. Thus, the aim of this study was to analyze cytogenetically representatives of the *Astyanax* e Probolodini clades of the eastern Brazilian coastal basins. Conventional staining (Giemsa) and molecular cytogenetic markers (GA₁₅ and CA₁₅) were used in species *Astyanax* aff. *fasciatus*, *A. giton*, *A. lacustris*, and *Deuterodon pedri* and *Astyanax* sp. 2. All analyzed individuals of *A. aff. fasciatus* presented $2n = 48$ chromosomes, with karyotypic formula $8m + 18sm + 18st + 4a$. As for the hybridization pattern of the GA₁₅ and CA₁₅ probes, these were found to be widely distributed across all karyotype chromosomes of the analyzed species, with a preferential accumulation in the terminal and pericentromeric regions, despite presenting noticeable differences in the hybridization pattern in each species. The results obtained did not allow the separation of species into distinct clades as proposed in the study by Silva (2017). Therefore, it is necessary to use more specific probes for species of the genus *Astyanax*, as well as a larger number of species analyzed concomitantly so that cytogenetic data could be another tool that validates these clades.

Keywords: Repetitive DNA. Cytogenetics. *Osteichthyes*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivos gerais.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
	REFERÊNCIAS.....	15
	ARTIGO.....	18
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3	RESULTADOS.....	22
4	DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO.....	29
6	AGRADECIMENTOS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que os peixes representem mais da metade da diversidade de vertebrados do mundo, sendo que dois terços de todas as espécies são de água doce (Reis *et al.*, 2003). Essas surgiram há mais de 500 milhões de anos e exibem uma diversidade incomparável em sua morfologia, fisiologia e habitats, o que torna a compreensão de sua história evolutiva e o estabelecimento de uma classificação, tão desafiadora (Nelson, 2016).

A recente história paleohidrográfica explica a presença de elevado número de espécies e gêneros endêmicos compartilhados entre os sistemas de drenagens que hoje estão isolados (Thomaz *et al.*, 2015). Um exemplo disso são as bacias costeiras, localizadas no leste do Brasil, que apresentam uma ictiofauna de grande importância biogeográfica uma vez que demonstram um alto grau de endemismo (Ribeiro, 2006).

O leste de Minas Gerais é composto pelas bacias do rio Pardo, do rio Jequitinhonha, do rio Doce e do rio Paraíba do Sul, nas quais se concentram a maior riqueza de espécies do estado (Drummond *et al.*, 2005). A maioria das espécies descritas na região é de pequeno porte (até 15 cm) e possui uma distribuição restrita a pequenos trechos das drenagens, condição delicada sob o ponto de vista da conservação, visto que impactos nessas áreas podem significar a extinção da espécie (Drummond *et al.*, 2005).

A ordem Characiformes é a maior e mais diversa dentre os peixes de água doce ocorrendo na África, sudoeste dos Estados Unidos, México, América Central e do Sul (Nelson, 2006). Reis e colaboradores (2003) afirmaram que essa ordem é composta por 18 famílias e 270 gêneros, já Nelson (2016) reconheceu pelo menos 24 famílias, cerca de 520 gêneros e cerca de 2300 espécies.

Dentre as famílias da ordem Characiformes, a Characidae é a mais diversa e complexa dos peixes neotropicais, com cerca de 1180 espécies (Eschmeyer e Fong, 2019). Essa família apresenta diversa variedade de formas, o que dificulta a classificação de agrupamentos naturais dentro da mesma. Apesar disso, o monofiletismo da família já foi confirmado em estudos realizados por Mirande, 2009 e Oliveira e colaboradores, 2011, porém, várias de suas espécies foram incluídas na condição de *incertae sedis*, incluindo todas as do gênero *Astyanax* (Lima *et al.*, 2003).

O estudo filogenético realizado por Oliveira e colaboradores (2011) recuperou três grandes clados na família Characidae: clados A, B e C. Sendo o clado C o que abrange o maior número de espécies e é considerado o menos compreendido, já que é formado, em sua

maioria, por gêneros *incertae sedis* (Mirande, 2009; Oliveira *et al.*, 2011). Já Silva (2017), utilizando dados morfológicos e moleculares, sugeriu um novo rearranjo sistemático dentro do clado C proposto por Oliveira e colaboradores (2011). A partir desse estudo houve uma diferenciação de dois novos clados dentro do clado C: o clado *Astyanax* e o clado Probolodini.

O clado *Astyanax* do estudo de Silva (2017) é constituído por 17 espécies, todas do gênero *Astyanax* Baird & Girard 1854, enquanto que o clado Probolodini que foi proposto inicialmente por Géry (1977) é composta 23 espécies. Sendo que no estudo de Silva (2017) o clado Probolodine é mais inclusivo apresentando 27 espécies (Tabela 1 e Figura 1).

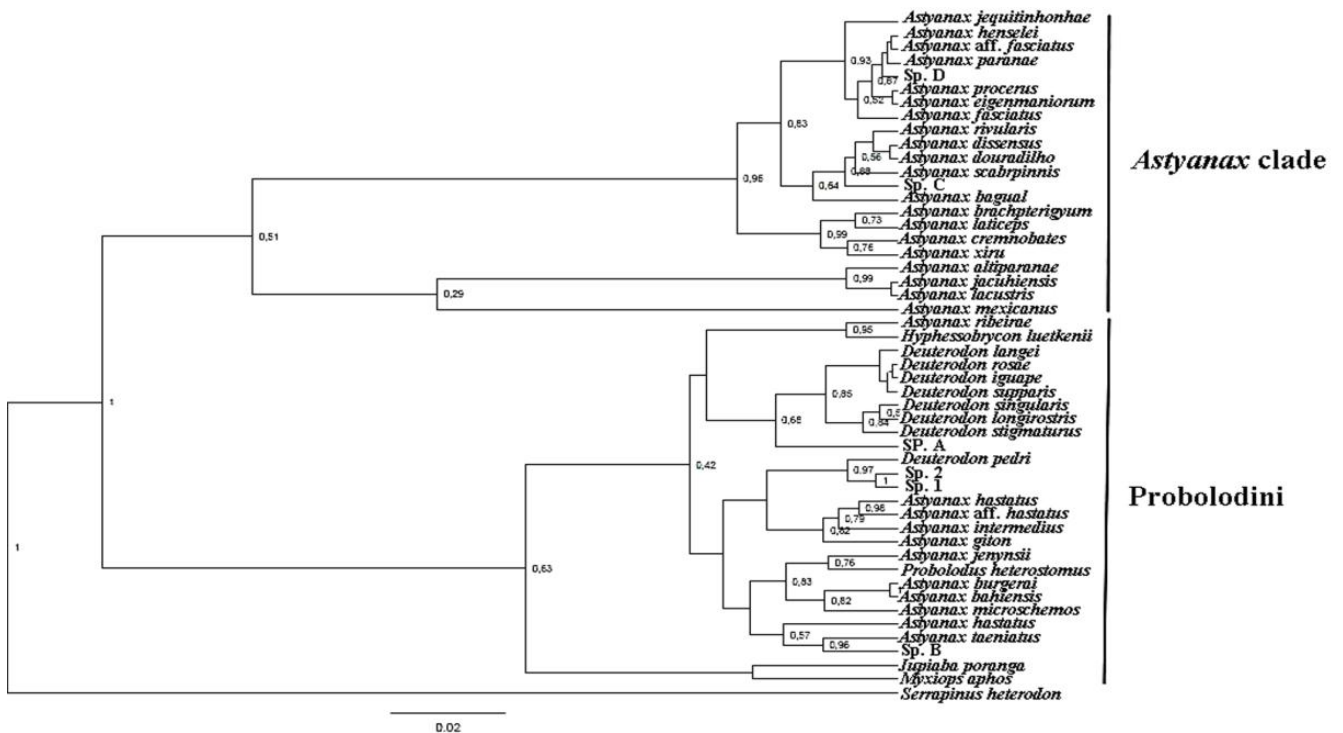
Tabela 1- Tabela com as espécies de constituem os clados *Astyanax* e Probolodine, propostos por Silva (2017), e o clado Probolodine proposto por Géry (1977).

CLADOS	ESPÉCIES
Clado <i>Astyanax</i> (Silva, 2017)	<i>Astyanax brachypterygium</i> Bertaco & Malabarba, 2001; <i>Astyanax cremnobates</i> Bertaco & Malabarba, 2001; <i>Astyanax dissensos</i> Lucena & Thofehn, 2013; <i>Astyanax douradilho</i> Bertaco, 2014, <i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819); <i>Astyanax</i> aff. <i>Fasciatus</i> ; <i>Astyanax scabripinnis</i> (Jenyns, 1842); <i>Astyanax xiru</i> Lucena, Castro & Bertaco, 2013; <i>Sp. D</i> ; <i>Sp. C</i> ; <i>Astyanax paranae</i> Eigenmann, 1911; <i>Astyanax eigenmaniorum</i> (Cope, 1894); <i>Astyanax rivularis</i> (Lütken, 1875); <i>Astyanax bagual</i> Bertaco & Vigo, 2015; <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski; 2000; <i>Astyanax jacuhiensis</i> (Cope, 1894) e <i>Astyanax mexicanus</i> (De Filippi, 1853).
Clado Probolodine (Silva, 2017)	<i>Probolodus heterostomus</i> Eigenmann, 1911; <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> (Boulenger, 1887); <i>Astyanax ribeirae</i> Eigenmann, 1911; <i>Astyanax</i> aff. <i>Microschemo</i> ; <i>Astyanax jenynsii</i> (Steindachner, 1877); <i>Astyanax bahiensis</i> (Steindachner, 1877); <i>Astyanax burgerai</i> Zanata & Camelier, 2009; <i>Astyanax hamatilis</i> Camelier & Zanata, 2014; <i>Astyanax taeniatus</i> (Jenyns, 1842); <i>Astyanax hastatus</i> Myers, 1928; <i>Astyanax giton</i> Eigenmann, 1908, <i>Astyanax intermedius</i> Eigenmann, 1908; <i>Deuterodon pedri</i> Eigenmann, 1908, <i>Astyanax pelecus</i> (Eigenmann, 1908); <i>Myxiops aphos</i> Zanata & Akama, 2004; <i>Deuterodon iguape</i> Eigenmann, 1907; <i>Deuterodon supparis</i> ,

	<i>Deuterodon stigmaturus</i> (Gomes, 1947); <i>Deuterodon singularis</i> Lucena & Lucena, 1992; <i>Deuterodon longirostris</i> (Steindachner, 1907); <i>Deuterodon rosae</i> (Steindachner, 1908) e <i>Deuterodon langei</i> Travassos, 1957.
Clado	<i>Probolodus heterostomus</i> ; <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> (Boulenger, 1887); <i>Astyanax ribeira</i> ; <i>Astyanax microschemos</i> ; <i>Astyanax jenynsii</i> ;
Probolodine	<i>Astyanax bahiensis</i> ; <i>Astyanax burgerai</i> ; <i>Astyanax taeniatus</i> ; <i>Astyanax hastatus</i> ; <i>Astyanax giton</i> ; <i>Astyanax intermedius</i> ; <i>Astyanax</i> aff. <i>Hastatus</i> ; <i>Deuterodon pedri</i> ; <i>Myxiops aphos</i> ; <i>Deuterodon iguape</i> ;
(Géry, 1977)	<i>Deuterodon supparis</i> Lucena & Lucena, 1992; <i>Deuterodon stigmaturus</i> ; <i>Deuterodon singularis</i> ; <i>Deuterodon longirostris</i> ; <i>Deuterodon rosae</i> ; <i>Deuterodon langei</i> ; <i>Sp. A</i> ; <i>Sp. B</i> ; <i>Sp. 1</i> ; <i>Sp 2</i> ; <i>Jupiaba poranga</i> ; <i>Serrapinus heterodon</i> (Eigenmann, 1915)

Fonte: Autoral

Figura 1 - Árvore filogenética proposta por Silva (2017).



Fonte: Silva (2017), p.64.

O mais recente estudo disponível foi feito por Mirande (2018), que através de caracteres morfológicos e moleculares propõe um novo rearranjo filogenético dentro da família Characidae. Uma nova tribo, dentro do clado C, denominada Grundulini é proposta, sendo composta pelos gêneros *Grundulus*, *Deuterodon*, algumas espécies classificadas atualmente em *Astyanax*, *Hyphessobrycon* e *Moenkhausia*, entre outros gêneros.

Essa proposta incluiu Probolodini proposto por Silva (2017) (agrupando os gêneros *Deuterodon*, *Probolodus*, *Myxiops* e algumas espécies de *Astyanax* de bacias costeiras) como parte de Grundulini, sendo este último então um grupo mais inclusivo. A amostragem de Mirande (2018) não incluiu em suas análises espécies de *Astyanax* de bacias costeiras e nem todas as espécies de *Deuterodon*. Assim, a validade de Probolodini como possível grupo irmão de Grundulini ou confirmação de que na verdade os táxons de Probolodini são parte de Grundulini ainda precisa ser testada.

O gênero *Astyanax* é um dos mais diversos da família Characidae com 147 espécies descritas (Eschmeyer e Fong, 2019). As espécies desse gênero são popularmente conhecidas como lambaris ou piabas, apresentam tamanho reduzido e normalmente habitam pequenos

riachos, ocorrendo dentro de drenagens de água doce do sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina (Lima *et al.*, 2003).

Em estudo realizado recentemente por Pazza e colaboradores (2018), foram analisadas sequências de DNA mitocondrial de espécies do gênero *Astyanax*, da região Neotropical, com o intuito de investigar os principais eventos cromossômicos compatíveis com a evolução molecular do gênero, visando encontrar importantes tendências evolutivas cromossômicas dentro deste táxon. Como resultado, obtiveram quatro clados distintos, sendo o primeiro composto por um conjunto de espécies que se assemelham as espécies que compõe o clado Probolodini, proposto por Silva (2017).

Estudos citogenéticos com peixes neotropicais denotam grande importância, uma vez que as informações fornecidas sobre a fixação dos rearranjos cromossômicos auxiliam na identificação de espécies crípticas por meio de análises citotaxômicas. Bertollo *et al.*, 1978; Oliveira *et al.*, 2000). A citogenética da família Characidae apresenta padrões heterogêneos nas suas diferentes subfamílias, sendo tal variedade um reflexo da natureza polifilética do grupo (Peres, 2008). Assim, os números diploides variam de $2n = 28$ em uma espécie de *Hemigrammus* (Schell, 1973) até $2n = 64$ cromossomos em *Serrasalmus hollandi* Eigenmann, 1915 (Muramoto *et al.*, 1968), havendo preponderância nos cariótipos $2n = 48$ e 52 cromossomos (Peres, 2008). Quanto ao gênero *Astyanax*, os estudos citogenéticos evidenciam uma variação cromossômica de $2n = 46$ a $2n = 50$. Apesar da pequena variação dos números cromossômicos, uma ampla variabilidade na morfologia dos cromossomos e número fundamental (NF) é encontrada entre as espécies (Almeida-Toledo *et al.*, 2002).

A estrutura e organização substancial do genoma de muitos eucariotos são análogas e compostas por uma parcela expressiva de sequências repetitivas que são caracterizadas por um número variável de cópias, com vasta distribuição e formas distintas de organização, podendo ser localizadas em áreas cromossômicas específicas ou amplamente espalhadas por regiões eucromáticas ou heterocromáticas (Charlesworth *et al.*, 1994). Essas sequências são amplamente conservadas entre os organismos e se tornaram importantes ferramentas para estudos relacionados com a regulação de genes, diferenciação cromossômica sexual e evolução do cariótipo (Schemberger *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2017).

Técnicas de citogenética convencional e molecular, como FISH (*fluorescence in situ hybridization*) são bastante utilizadas em estudos citotaxômicos, uma vez que, tais estudos podem revelar uma diversidade biológica que não é visível através de análises morfométricas e merísticas simples fornecendo uma maneira útil de entender os mecanismos de especiação que atuam nos organismos (Vitorino *et al.*, 2011). A técnica FISH se baseia na utilização de

sondas marcadas com fluorocromos que hibridizam em regiões específicas do DNA nos cromossomos, permitindo uma comparação de espécies e populações de peixes, colaborando com a interpretação da diversidade desse grupo (Teixeira *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2012).

Ciofi e colaboradores (2009), em estudo com *Hoplias malabaricu* (Bloch, 1794), enfatizam a importância dos estudos com sequências repetitivas, onde concluem que a investigação *in situ* dessas sequências adicionam novos caracteres informativos, fundamentais em genômica comparativa em nível cromossômico e fornece prognósticos sobre as relações evolutivas dos grupos.

No estado de Minas Gerais existem poucos estudos citogenéticos realizados em espécies do clado Probolodini (Silva, 2017). Dentre os pesquisados estão os trabalhos com as espécies *Astyanax taeniatus*, no rio Doce (Cunha *et al.*, 2016), *Astyanax intermedius* e *Astyanax giton* no rio Paraíba do Sul (Kavalco e Moreira-Filho, 2003) e *Deuterodon pedri* espécie característica do rio Santo Antônio (Sanches e Dergam, 2015).

O entendimento dos processos evolutivos que contribuíram para a diversificação dos gêneros e espécies em Characidae no clado C, pode ser facilitado por meio de análises citogenéticas. Esse estudo é de grande importância para auxiliar na elucidação das relações filogenéticas dos clados *Astyanax* e Probolodini, uma vez que, regiões de DNA repetitivo podem demonstrar a evolução cariotípica das espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar citogeneticamente representantes dos clados *Astyanax* e Probolodini das bacias costeiras do leste brasileiro com o intuito caracterizar tendências de evoluções cromossômicas que corroborem com a proposta de Silva (2017), utilizando marcadores citogenéticos clássicos e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- I. Descrever o cariótipo das espécies *Astyanax* aff. *fasciatus* e *A. lacustris*, representantes do clado *Astyanax*, assim como, *A. giton*, *Deuterodon pedri* e *Astyanax* sp. 2 pertencentes ao clado Probolodini.
- II. Comparar as espécies com base nos padrões de marcação de DNA repetitivo, utilizando as sondas GA₁₅ e CA₁₅.

REFERÊNCIAS

- 1 ALMEIDA-TOLEDO L. F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA M. F. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, characidae). **Cytogenet and Genome Research**, v. 97, p. 229-233, 2002.
- 2 BARBOSA, P.; LEAL, E. V.; SILVA, M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F. Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 11, p. 143-162, 2017.
- 3 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- 4 CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- 5 CUNHA, M. S.; REIS, V. J. C.; DERGAM, J. A. Closely related syntopic cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce basin in Southeastern Brazil. **Zebrafish**, v. 13, p. 112-117, 2016.
- 6 DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; MACHADO, A. B. M.; SABAIO, F. A.; ANTONINI, Y. Biodiversidade em Minas Gerais. **Fundação Biodiversitas**, Belo Horizonte. Segunda Edição, p. 72-81, 2005.
- 7 ESCHMEYER, W. N; FONG, J. D. Editors: Speciesoffishesbyfamily/subfamily [Internet]. Available from: <[http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species ByFamily.asp](http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species%20ByFamily.asp)>, 2019.
- 8 GÉRY, J. Characoids of the World. **Neptune: T. F. H. Publications**, v. 34 p. 893, 1977.
- 9 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, p. 453-461, 2003.
- 10 LIMA, F. C. T; MALABARBA, L. R; BUCKUP, P. A; PEZZI DA SILVA, J. F., VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. **Genera incertae sedis in Characidae. In: Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, 2003.
- 11 MARTINEZ, E.; ALVES, A.; SILVEIRA, S. M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes,

- Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 41-51, 2012.
- 12 MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, p. 574-613, 2009.
 - 13 MIRANDE, J.M. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, v. 35, p. 282-300, 2018.
 - 14 NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 5^o ed. New Jersey. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.
 - 15 OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S; ABE, K. T. Phylogenetic relationships within the species on family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in groups ampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-25, 2011.
 - 16 OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, L.F; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. **VIII Simposium de Citogenética e Genética de Peixes**, 2000.
 - 17 PAZZA, R; DERGAM, J. A; KAVALCO, K. F. Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei: Characiformes: Characidae): Insights from molecular data. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 1-11, 2018.
 - 18 PERES, W. A. M; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v, 31, p. 222-226, 2008.
 - 19 REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Checklist of the Freshwater fishes of Central and South America**. Edipucrs, PUC, Porto Alegre, RS, 2003.
 - 20 RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 225-246, 2006.
 - 21 SCHEMBERGER, M. O; OLIVEIRA J. I. N; NOGAROTO, V. Construction and Characterization of a Repetitive DNA Library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A Genomic and Evolutionary Approach to the Degeneration of the W Sex Chromosome. **Zebrafish**, v. 11, p. 518-527, 2014.
 - 22 SILVA, P. C. **Sistemática Integrativa-Diversidade e relações de Deuterodon e gêneros afins**. 2017. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2017.
 - 23 TEIXEIRA, W. G.; FERREIRA, I. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C., MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G. T.; PINHAL, D.; POLETTO, A. B. VENERE P. C.; MARTINS C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the

- cichlid fish *Cichlaxelberia* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 224-234, 2009.
- 24 THOMAZ, A. T.; MALABARBA L. R.; BONATTO S. L.; KNOWLES, L. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 42, p. 2389-2401, 2015.
- 25 VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; ROSA, J. N.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; VENERE, P. C. Molecular cytogenetics and its contribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v. 78, p. 1239-1248, 2011.
- 26 WEITZMAN, S. H.; FINK, W. L. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei: Characidae), with comments on the phylogeny of New World characiforms. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 150, p. 339-395, 1983.

ARTIGO**DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES DOS CLADOS *Astyanax* E
PROBOLODINI (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) EM BACIAS COSTEIRAS
DO LESTE BRASILEIRO**

Mariane Alves Brito Pinto

Laboratório de Sistemática Molecular-Beagle, Departamento de Biologia Animal,
Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, 36570-900, Minas
Gerais, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

A família Characidae é a mais diversa e complexa dos peixes neotropicais, composta por uma diversa variedade de formas, o que dificulta a classificação de agrupamentos naturais dentro da mesma. Apesar do monofiletismo da família já ser confirmado, um grande número de espécies da família Characidae, foram incluídas na condição de *incertae sedis*, incluindo todas as do gênero *Astyanax* (Lima *et al.*, 2003; Mirande, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Eschmeyer e Fong, 2019).

Em 2011, Oliveira e colaboradores realizaram um estudo filogenético onde retomaram três grandes clados na família Characidae: clados A, B e C, sendo o clado C o que apresenta o maior número de espécies consideradas *incertae sedis*. Já Silva (2017), utilizando dados morfológicos e moleculares, sugeriu um novo rearranjo sistemático, onde dois novos clados foram criados dentro do clado C: o clado *Astyanax* e o clado Probolodini.

Em estudo realizado por Pazza e colaboradores (2018), foram analisadas sequências de DNA mitocondrial de espécies do gênero *Astyanax*, da região Neotropical, onde obtiveram quatro clados distintos, sendo o primeiro composto por um conjunto de espécies que se assemelham as espécies que compõe o clado Probolodini proposto por Silva (2017). Entretanto, o mais recente estudo disponível foi feito por Mirande (2018), no qual foi proposto um novo rearranjo filogenético dentro da família Characidae. Uma nova tribo, denominada Grundulini, agrupou os gêneros *Deuterodon*, *Probolodus*, *Myxiops* e algumas espécies de *Astyanax* de bacias costeiras, além de incluir o grupo Probolodini proposto por Silva (2017), o que tornou a proposta de Mirande (2018) mais inclusiva.

Análises citotaxômicas auxiliam na identificação de espécies crípticas umas ves que esses estudos citogenéticos fornecem informações sobre a fixação dos rearranjos cromossômicos (Bertollo *et al.*, 1978; Oliveira *et al.*, 2000). No gênero *Astyanax*, os estudos citogenéticos evidenciam uma variação cromossômica de $2n = 46$ a $2n = 50$. Apesar da pequena variação dos números cromossômicos, uma ampla variabilidade na morfologia dos cromossomos e número fundamental (NF) é encontrada entre as espécies (Almeida-Toledo *et al.*, 2012). Técnicas de citogenética convencional e molecular, como FISH (fluorescence *in situ* hybridization) auxiliam nos estudos citotaxomônicos, fornecendo uma ferramenta útil para entender os mecanismos de especiação que atuam nos organismos (Vitorino *et al.*, 2011). Em peixes, a técnica FISH permite uma comparação de espécies e populações, colaborando com a interpretação da diversidade desse grupo (Teixeira *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2012).

O entendimento dos processos evolutivos que contribuíram para a diversificação dos gêneros e espécies em Characidae no clado C, pode ser facilitado por meio de análises citogenéticas. Dessa forma, o objetivo desse estudo é analisar cariótipos e regiões de DNA repetitivo de alguns representantes dos clados *Astyanax* e Probolodini auxiliando na elucidação das relações filogenéticas de tais grupos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados trinta e sete indivíduos em seis localidades, estes, depois de identificados por uma taxonomista especializada em Characidae, foram diferenciados em cinco espécies, *Astyanax* aff. *fasciatus*, *Astyanax giton*, *Astyanax latustris*, *Deuterodon pedri* e *Astyanax* sp.2 (mesma espécie identificada por Silva, 2017), distribuídas entre os clados *Astyanax* e Probolodini, (Tabela 2). As coletas foram feitas com a licença número 14975-1, emitida pelo ICMBio para Jorge Abdala Dergam. Os espécimes foram depositados na coleção científica do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (lotes MZUFV 4407, MZUFV 4884, MZUFV 4899, MZUFV 4902, MZUFV 4906, MZUFV 4972, MZUFV 5662 e MZUFV 5669).

Os animais foram anestesiados e eutanasiados com solução aquosa com óleo de cravo na concentração 300 mg.L^{-1} segundo (Lucena *et al.*, 2013) em concordância com a autorização 024/2018 do comitê de ética da Universidade Federal de Viçosa. Para a obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos foi utilizada a metodologia proposta por Bertollo *et al.* (1978). Os cariótipos foram analisados com o auxílio do software Image - Pro Plus® e classificados seguindo a razão de braços (RB), proposta por Levan *et al.* (1964). Para cada espécime foram selecionadas as melhores metáfases, para montagem de cariótipos. Para as técnicas de hibridização fluorescente in situ (FISH) com sondas de DNA repetitivo CA₁₅ e GA₁₅, realizada segundo o protocolo de Pinkel *et al.* (1986). Todas as metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX53 câmera XM 10 e as fotos analisadas em Adobe Photoshop CS 8.

Tabela 2 - Locais de coleta e tamanho amostral das populações de *Astyanax lacustris*, *Astyanax fasciatus*, *Astyanax giton*, *Deuterodon pedri* e *Astyanax* sp. 2.

Espécie	Local	Bacia Hidrográfica	GPS	Tamanho Amostral
<i>A. aff. fasciatus</i>	Rio Glória, Muriaé MG, Brasil	Paraíba do Sul	20°47'50.2"S 42°19'12.2"W	3♀/7♂
<i>A. giton</i>	Rio Glória, Muriaé MG, Brasil	Paraíba do Sul	20°47'50.2"S 42°19'12.2"W	3♀
	Rio Jacutinga MG, Brasil		22°6'35,37"S 44°5'48,488"W	1♀
	Drenagem do rio Doce- Coimbra MG, Brasil	Rio Doce	22°6'35,37"S 44°5' 48,488"W	2♀
	Usina Hidrelétrica Risoleta Neves - Candongá, MG, Brasil		20°12'31"S 42°51'19"W	1♀
<i>A. latustris</i>	Rio Pomba MG, Brasil	Paraíba do Sul	21°18'32.8"S 42°53'59.4"W	3♀/3♂
<i>D. pedri</i>	Rio Santo Antônio MG, Brasil	Rio Doce	19°12'59,5"S 43°16'13,9"W	4♀
<i>Astyanax</i> sp. 2	Rio do Peixe MG, Brasil	Paraíba do Sul	20°11'01,4"S 42°57'35,4"W	9♀

Fonte: Autoral

3 RESULTADOS

Todos os indivíduos analisados de *A. aff. fasciatus* apresentaram $2n = 48$ cromossomos, com fórmula cariotípica de $8m+18sm+18st+4a$ (Figura 2A). Para as demais espécies estudadas o número diploide foi semelhante a $2n=50$ cromossomos, sendo observadas as seguintes fórmulas cariotípicas: *A. giton* $6m+12mt+10st+20a$; *A. lacustris* $6m+20sm+18st+6a$; *D. pedri* $12m+12sm+20st+6a$ e *Astyanax* sp. 2 $6m+14mt+14st+16a$ (Figuras 2B, 2C, 2D e 2E), respectivamente.

Figura 2 - Cariótipos corados com Giemsa. A) *A. aff. fasciatus*; B) *A. giton*; C) *A. lacustres*; D) *D. pedri*; E) *Astyanax* sp. 2.

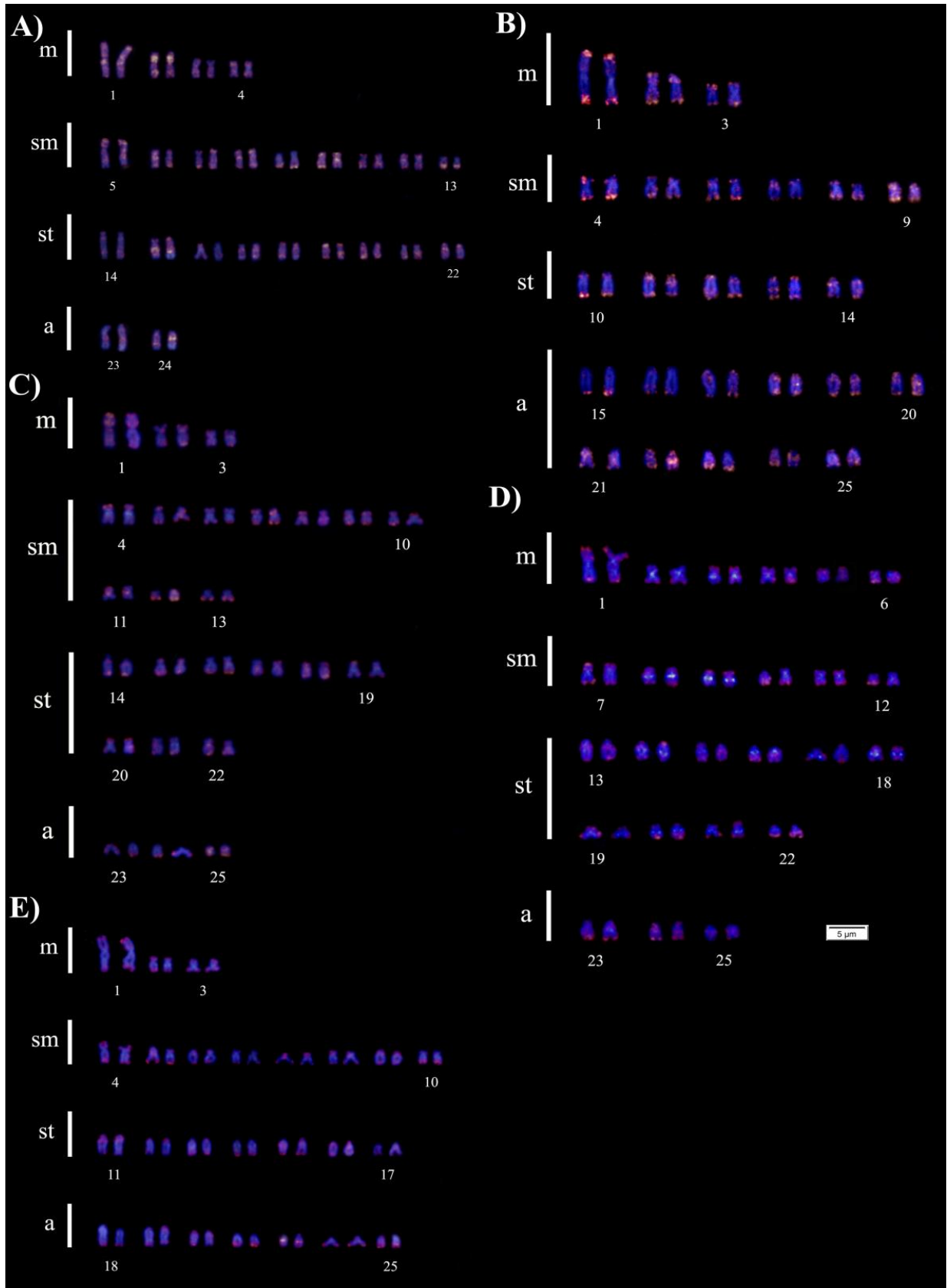


Fonte: 2A, 2A, 2D e 2E: Autoral; 2C: Cunha *et al.* (2019), p. 6.

A sonda GA₁₅ apresentou uma hibridização nas regiões terminais de ambos os braços para a maioria dos pares cromossômicos nas cinco espécies estudadas. Também foi possível detectar marcações intersticiais no braço menor do primeiro par metacêntrico em todas as espécies (Figura 3). Na espécie *A. aff. fasciatus*, o par cinco apontou uma marcação terminal apenas no braço maior além de uma marcação intersticial no braço maior nos pares vinte três e vinte cinco. Já em *A. giton* foi observada uma marcação intersticial no braço maior nos pares treze, quatorze, dezoito, trinta, vinte um e vinte dois (Figura 3A e 3B). Em *A. lacustris* o cariótipo apresentou hibridizações na região pericentromérica nos pares cromossômicos onze e quatorze. O par quatro teve uma marcação terminal apenas no braço menor, enquanto que o par treze essa marcação se deu somente no braço maior (Figura 3C). Na espécie de *D. pedri* foram observadas marcações nas regiões terminais de ambos os braços para todos os pares cromossômicos e pericentroméricas nos pares acrocêntricos (Figura 3D). E o *Astyanax* sp. 2 os cromossomos evidenciaram marcações pericentroméricas nos pares acrocêntricos dezanove, vinte, vinte dois e vinte três, além de marcações intersticiais no braço maior nos pares vinte dois e onze (Figura 3E).

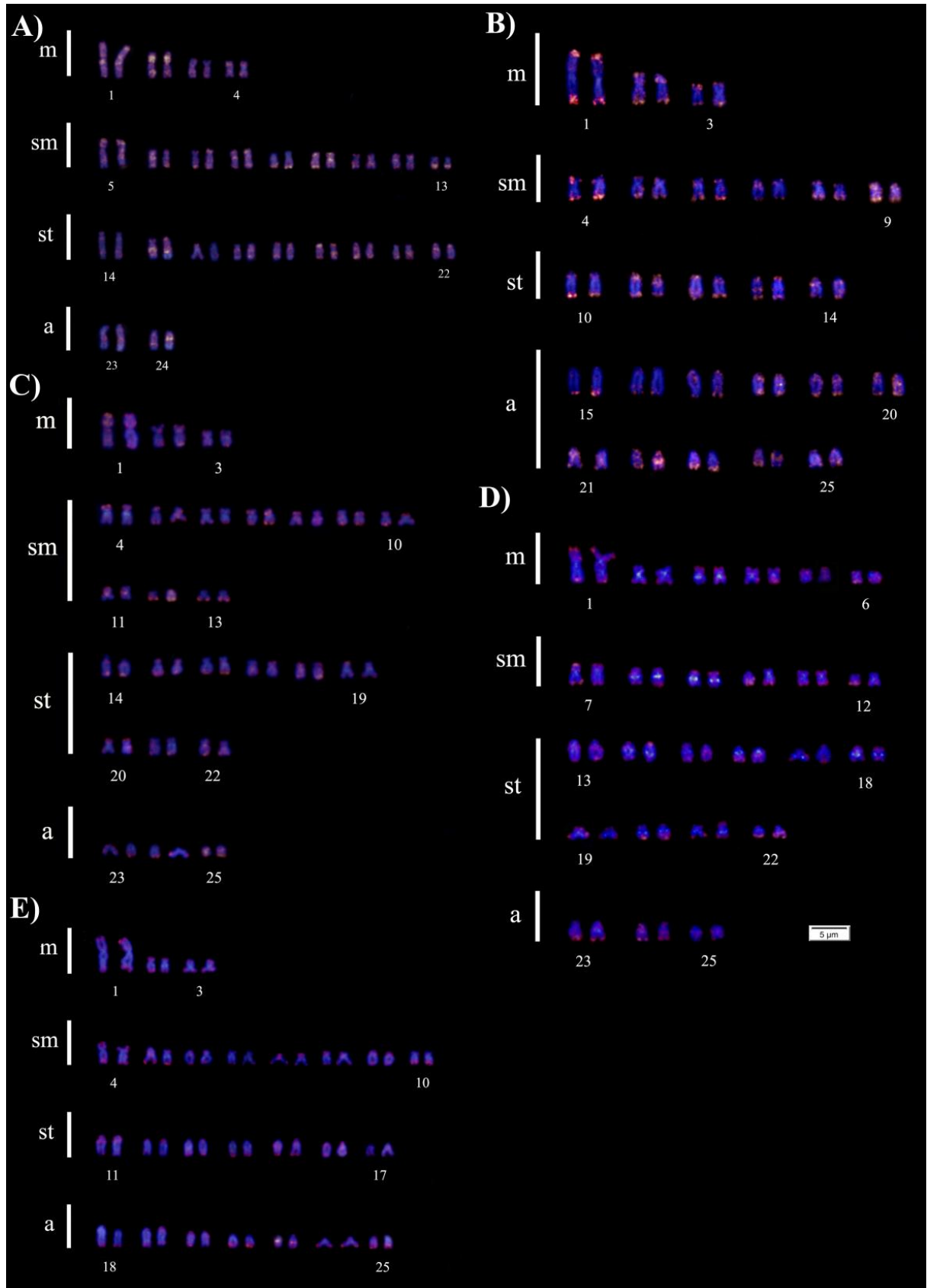
A sonda de sequência repetitiva CA₁₅ exibiu uma hibridização nas regiões terminais do braço maior na maioria dos cromossomos de todas as espécies estudadas. Além disso, uma marcação intersticial no braço menor, foi observado no primeiro par de cromossomos nas espécies *A. giton*, *A. lacustris*, *D. pedri* e *Astyanax* sp. 2 (Figuras 4B, 4C, 2D e 2E), respectivamente. Nas espécies *A. lacustris*, *D. pedri* e *Astyanax* sp. 2 (Figuras 4C, 2D e 2E) apresentaram um grande número de marcações pericentrométicas. Já em *A. aff. fasciatus* é possível observar blocos de marcação CA₁₅ na região pericentrométrica dos pares, acrocêntricos, vinte três e vinte quatro. Esses blocos também foram observados nos pares três e quinze na porção terminal do braço maior e nos pares cinco, quatorze e quinze na região terminal do braço menor (Figuras 4A). *D. pedri* realçou uma marcação intersticial no braço maior na maioria dos pares cromossômicos. Em *A. lacustris* e *A. giton*, também foram observadas essas marcações em alguns pares, diferentemente das espécies *A. aff. fasciatus* e *Astyanax* sp. 2, que não evidenciaram hibridização para esta mesma região nos cromossomos.

Figura 3 - Padrões de hibridização da sonda GA₁₅ nas cinco espécies estudadas. A) *A. aff. fasciatus*; B) *A. giton*; C) *A. lacustris*; D) *D. pedri*; E) *Astyanax* sp. 2.



Fonte: autoral

Figura 4 - Padrões de hibridização obtidos com o uso da sonda CA₁₅ nas cinco espécies estudadas. A) *A. aff. fasciatus*; B) *A. giton*; C) *A. lacustris*; D) *D. pedri*; E) *Astyanax* sp. 2.



Fonte: Autoral

4 DISCUSSÃO

Entre as cinco espécies pesquisadas, *A. giton*, *A. lacustris*, *D. pedri* e *A. sp 2* apresentaram o mesmo número diploide, $2n = 50$ cromossomos e fórmulas cariotípicas distintas. Entretanto, *A. aff. fasciatus* apresentou um cariótipo composto por 48 cromossomos.

O número cromossômico observado neste estudo em *A. giton* é semelhante ao encontrando em estudos realizados por Kavalco e Moreira-Filho (2003), Kavalco e colaboradores (2004) e Kavalco e colaboradores (2007). Porém, houve uma variação quanto à fórmula cariotípica, uma vez que os três estudos citados apresentam $6m+8sm+8st+28a$ enquanto que o presente estudo apresentou fórmula cariotípica $6m+12sm+10st+20a$. Apesar das variações encontradas, ainda se observa um alto número de cromossomos acrocêntricos, sendo tal, uma característica marcante da espécie (Kavalco *et al.*, 2007). A espécie *Astyanax* Sp. 2, apresentou seis pares de cromossomos metacêntricos e um alto número de cromossomos acrocêntricos, o que também, foi encontrado para *A. giton*.

A espécie *A. fasciatus* apresenta uma alta variabilidade quanto ao seu número diploide, onde são comumente encontrados três citótipos diferentes $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$, além de algumas variações, como, $2n = 45$, 47 e 49 cromossomos, possivelmente resultado de hibridizações (Pazza *et al.*, 2006; Artoni *et al.*, 2006). O número diploide $2n = 46$ cromossomos já foi descrito para os espécimes do alto do rio Paraná, (Morelli *et al.*, 1983; Pazza *et al.*, 2006; Fernandes, 2006). O citótipo $2n = 48$ cromossomos, assim como, encontrado nesse estudo, já foi descrito no Rio Paraíba (Oliveira, 1988), Mogi-Guaçu (Kavalco *et al.*, 2016), Alto Paraná (Pazza *et al.*, 2008), rio Corumbataí –SP (Piscor e Parise-Maltempi, 2016), rio São Francisco (Melo, 2005) e para região do Nordeste brasileiro (Medrado *et al.*, 2008). Já $2n = 50$ cromossomos foi encontrado no alto rio Tibagi (Artoni *et al.*, 2006) e Rio Corumbataí (Piscor *et al.*, 2017). Além da variação do número diploide, várias fórmulas cariotípicas são descritas nesta espécie, sendo que, nenhuma das apresentadas nos estudos citados acima se assemelham a encontrada nesse estudo.

Dentro do complexo *A. bimaculatus* ocorre uma conservação do número diploide de $2n = 50$ cromossomos, porém, apresentam diferenças na fórmula cariotípicas com predominância de cromossomos submetacêntricos (Pazza e Kavalco, 2007; Pazza *et al.*, 2018). O estudo realizado por Cunha *et al.* (2019), com espécies inerentes ao complexo *A. bimaculatus*, demonstrou através de dados moleculares e citogenéticos que as espécies que ocorrem nas bacias costeiras apresentam uma grande homogeneidade cariotípica, diferentemente dos complexos *A. bimaculatus* e *A. altiparanae* das regiões continentais.

Dessa forma, as espécies encontradas nas bacias costeiras foram classificadas como *Astyanax lacustris*. O presente estudo valida o estudo feito por Cunha e colaboradores (2019), uma vez que apresentou mesmo número diploide e fórmula cariotípica (6m+20sm+18st+6A) para espécie identificada como *Astyanax lacustris*, além de um alto número de cromossomos submetacêntricos, o que foi encontrado no estudo realizado por Pazza e colaboradores (2018).

Deuterodon pedri apresentou o mesmo número cromossômico e fórmula cariotípica encontrado por Sanches e Dergam (2015). Esta espécie é endêmica da bacia do Rio Doce (Silva *et al.*, 2017) e está incluída no gênero *Deuterodon* que foi considerado *incertae sedis* por Lima e colaboradores (2003) e posteriormente adicionado no “clado C” proposto por Oliveira e colaboradores (2011), onde se agrupa o maior número de espécies *incertae sedis*, juntamente com o gênero *Astyanax*. Estudos morfológicos e moleculares atestam a existência de diferentes linhagens de *Astyanax* e a estreita relação de algumas de suas espécies com outros gêneros (Mirande, 2009; Javonillo *et al.*, 2010).

As pequenas diferenças encontradas nas fórmulas cariotípicas das espécies analisadas em relação a outros estudos são, possivelmente, devido a rearranjos não-Robertsonianos e inversões pericentroméricas (Pazza e Kavalco, 2007). Estudos cariotípicos comparativos de localidades distintas são úteis para identificar a estrutura populacional ou a presença de unidades evolutivas únicas e espécies crípticas, uma vez que uma grande variação citogenética tem sido relatada em espécies de *Astyanax* (Medrado, 2015).

Em peixes, a hibridação de sondas de DNA repetitivo contribui no esclarecimento sobre a relação entre espécies e sua diversificação cariotípica, análise da organização genômica e evolução das espécies (Kavalco, 2008; Cioffi e Bertollo, 2012). Além disso, estas sequências de DNA auxiliam no conhecimento da estrutura cromossômica, origem e evolução dos cromossomos B e cromossomos sexuais (Martins *et al.*, 2004; Galetti e Martins, 2004; Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Schemberger *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2011).

Para o gênero *Astyanax*, as sondas de DNA repetitivo mais estudadas são rDNA 18S e 5S (Kavalco e Moreira-Filho, 2003; Mantovani *et al.*, 2005; Sanches e Dergam, 2015; Kavalco *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2019;). Para algumas espécies outras sequências repetitivas têm sido analisadas, como por exemplo, o DNA satélite As51, além de sequências histônicas (Kavalco *et al.*, 2011; Piscor e Parise-Maltempi, 2016; Medrado *et al.*, 2015). Porém existem poucos dados sobre a distribuição das sequências CA₁₅ e GA₁₅, em espécies do gênero. Para a espécie *Astyanax taeniatus* o padrão de hibridização da sonda GA₁₅ se deu nas regiões subteloméricas foi encontrado com o uso da de todos os cromossomos, contudo, a sonda CA₁₅

apresentou um padrão de distribuição centromérica, em alguns pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntrico (Cunha *et al.*, 2016).

As sequências de microssatélites CA₁₅ e GA₁₅ foram encontradas amplamente distribuídas por todos os cromossomos do cariótipo das espécies analisadas, com um acúmulo preferencial nas regiões terminais e pericentroméricas, apesar de apresentarem perceptíveis diferenças no padrão de hibridização em cada espécie. O padrão de distribuição preferencial nas regiões terminais também foi observado em peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) (Sene, 2016) e do gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Cioffi *et al.*, 2011).

Os padrões de hibridização da sonda CA₁₅ em *A. aff. fasciatus* apresentou blocos de marcações em alguns pares cromossômicos nas regiões terminais, enquanto que a sonda GA₁₅ as marcações se deram de forma mais dispersa, assim como observado no estudo realizado por Piscor e Parise-Maltempo (2016). As espécies *A. giton*, *A. lacustris*, *D. pedri* e *Astyanax* sp. 2 apresentaram uma marcação intersticial no braço menor do primeiro par acrocêntrico, padrão não descrito, até o momento, para tais espécies.

No estudo realizado por Pazza e colaboradores (2018) foi observada a ausência de hibridização da sonda As51 nos cromossomos de algumas espécies representantes do clado Probolobine proposto por Silva (2017). Enquanto que essa mesma sonda apresentou alguns pontos de hibridização para espécies do complexo *bimaculatus* e espécies que compõe o “clado 4” proposto por Pazza e colaboradores (2018), o que demonstra uma diferença entre espécies que compõe os clados *Astyanax* e Probolodine proposto por Silva (2017).

5 CONCLUSÃO

A utilização de técnicas citogenéticas permitiu a descrição do cariótipo das espécies *A. giton*, *A. aff. fasciatus* e *A. Sp. 2*, além da descrição do padrão de hibridização das sondas CA₁₅ e GA₁₅ para as cinco espécies estudadas, contribuindo para o melhor conhecimento da sua organização cromossômica. Os resultados obtidos não permitiram a separação das espécies em clados distintos como proposto no estudo de Silva (2017). Portanto, se faz necessário o uso de sondas mais específicas para espécies, que atualmente, pertencem ao gênero *Astyanax*, assim como, um maior número de espécies analisadas concomitantemente, para que os dados citogenéticos sejam mais uma ferramenta que corrobore como estudo Silva (2017).

6 AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1 ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): Evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 197-202, 2006.
- 2 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- 3 ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Editors: Speciesoffishesbyfamily/subfamily [Internet]. Available from: <[http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species ByFamily.asp](http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species%20ByFamily.asp)>, 2019.
- 4 FERNANDES, C. A. **Estudos citogenéticos em três espécies do gênero *Astyanax*, com ênfase no DNA ribossomal**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 74f.
- 5 GALETTI JR, P. M.; MARTINS C. Contribuição da hibridação in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra M (Ed). *Fluorescence in situ hybridization: conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto, 2004.
- 6 JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 498-511, 2010.
- 7 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, 2003.
- 8 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river Basin, Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 107-110, 2004.
- 9 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 329-335, 2007.

- 10 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO K. O.; GARCIA C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 108-119, 2011.
- 11 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosomal diversification higher than molecular variation in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 13.4, p. 345-353, 2016.
- 12 LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.
- 13 LUCENA, C. A. S. 1993. **Estudo Filogenético da Família Characidae com uma Discussão dos Grupos Naturais Propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1993
- 14 MARTINEZ, E.; ALVES, A.; SILVEIRA, S. M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 41-51, 2012.
- 15 MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, p. 574-613, 2009.
- 16 MIRANDE, J. M. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, v. 35, p. 282-300, 2018.
- 17 MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, p. 235-244, 1983.
- 18 OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T. Phylogenetic relationships within the species on family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in groups amplifying. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 275, 2011.
- 19 OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. **VIII Simposium de Citogenética e Genética de Peixes**, 2000.
- 20 OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, A. S. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Revista brasileira de Genética**, v. 11, p. 577-624, 1988.
- 21 SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA M. C.; SCHÜHLI G. S.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely

- related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genética**, v. 139, p. 11-12, 2011.
- 22 SILVA, P. C. Sistemática Integrativa- **Diversidade e relações de Deuterodon e gêneros afins**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 199p, 2017.
- 23 SILVA, P. C.; MALABARBA, M. C.; MALABARBA, L. R. Using ancient DNA to unravel taxonomic puzzles: the identity of *Deuterodon pedri* (Ostariophysi: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 15, 2017.
- 24 PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 3, p. 218-223, 2007.
- 25 PAZZA, R; DERGAM, J. A; KAVALCO, K. F. Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei: Characiformes: Characidae): Insights from molecular data. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 131, 2018.
- 26 PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *styanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Karyotypic 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.
- 27 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1986, p. 2934-2938, 1986.
- 28 PISCOR, D.; CENTOFANTE, L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Distinct classical and molecular cytogenetics of *Astyanax marionae* and *A. fasciatus* (Characiformes: Characidae): a comparative study of the organization of heterochromatin and repetitive genes. **Journal of genetics**, v. 96, p. 665-671, 2017.
- 29 PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic conservation of repetitive genes. **Genome**, v. 59, p. 167-172, 2016.
- 30 TEIXEIRA, W. G.; FERREIRA, I. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; PINHAL, D.; POLETTO, A. B.; VENERE, P. C.; MARTINS, C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichlaxelberia* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 224-234, 2009.
- 31 VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; ROSA, J. N.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; VENERE, P. C. Molecular cytogenetics and its contribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v. 78, p. 1239-1248, 2011.