

ARIANA DA SILVA NETO

**FILOGEOGRAFIA CARIOTÍPICA E MOLECULAR DE *Geophagus brasiliensis*
(QUOY & GAIMARD, 1824) (PERCIFORMES: CICHLIDAE) NAS BACIAS DO
SUDESTE BRASILEIRO: SUBSÍDIOS PARA A BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA
DO TÁXON**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S586f
2017
Silva Neto, Ariana, 1988-
Filogeografia cariotípica e molecular de *Geophagus
brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Perciformes: Cichlidae)
nas bacias do sudeste brasileiro : subsídios para biogeografia
histórica do taxón / Ariana Silva Neto. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Acará (Peixe). 2. Citogenética. 3. Molecular .
4. Cichlidae. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia
Animal. II. Título.

CDD 22 ed. 597.74

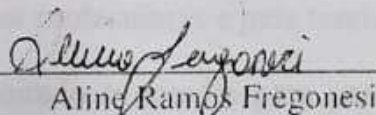
ARIANA DA SILVA NETO

**FILOGEOGRAFIA CARIOTÍPICA E MOLECULAR DE *Geophagus brasiliensis*
(QUOY & GAIMARD, 1824) (PERCIFORMES: CICHLIDAE) NAS BACIAS DO
SUDESTE BRASILEIRO: SUBSÍDIOS PARA A BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA
DO TÁXON**

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

APROVADA: 16 de outubro de 2017.


Rubens Pádua


Aline Ramos Fregonesi


Jorge Abdala Dergam dos Santos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar e colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, Elza e José Maria, por todo o amor, o apoio, por serem meu alicerce, por acreditarem em mim e me darem forças ao longo do caminho.

Aos meus irmãos, Bruno e Estela por todo o carinho e apoio.

Aos familiares que, de alguma forma, seja orando ou torcendo, contribuíram para esse resultado.

Ao meu cunhado pelas cervejas dos finais de semanas.

Aos meus amigos: Janaúba e Cássia por serem meus melhores parceiros, sempre me ouvindo, me acolhendo e me apoiando nesses últimos anos. A Cynthia pela amizade e companheirismo durante todo o mestrado, você me deu forças para chegar até aqui. A Sanely por sempre me fazer rir e ter aquela palavra amiga e acolhedora. A Magrela pela amizade, apoio e torcida.

Aos amigos do Beagle: Filipe por toda a ajuda na pesquisa, pelos ensinamentos compartilhados, pela companhia diária e pela torcida. A Marininha que foi minha coorientadora sem ser e por sempre ter uma ideia para o sucesso do Fish. Ao Fred (nada) e a Bianca meus parceiros de Fish. A Nati Freitas pela ajuda com o 18 e 5S. Ao Bruno, Késsia, Cristhian, Simone, Mariane, Daniel, Daniela e Jonas pela torcida e companheirismo.

Aos amigos, da BIO10, CoordShow, Toda Boa e ACM pela torcida e pela diversão.

Aos amigos, que mesmo distantes sempre estiveram na torcida.

Ao professor Jorge, por ter me aceitado em seu laboratório, pelo voto de confiança, por acreditar na minha capacidade de conduzir esse estudo e por todo o conhecimento compartilhado nesses últimos anos.

A Manuela pela coorientação, pela ajuda com as análises moleculares e pela torcida.

Ao professor Rubens Pazza e a Aline, por terem aceitado o convite para participar da minha banca de defesa.

Ao programa de Pós graduação em Biologia Animal pela oportunidade de cursar o mestrado.

A FAPEMIG pela bolsa de fomento e a Universidade Federal de Viçosa pela estrutura oferecida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	4
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral:.....	7
2.2 Objetivos Específicos:	7
ARTIGO.....	8
CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE <i>Geophagus brasiliensis</i> (QUOY & GAIMARD, 1824) (TELEOSTEI: CICHLIDAE) NO SUDESTE BRASILEIRO.....	8
3. INTRODUÇÃO	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Espécimes e preparação cromossômica.....	13
4.2 Procedimentos/ Técnicas Moleculares	15
4.2.1 Extração de DNA	16
4.2.2 Reações de amplificação e sequenciamento dos produtos de PCR.....	16
4.2.3 Alinhamento das sequências e análises	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Resultados citogenéticos	17
5.2 Dados moleculares	20
5.2.1 Variação do gene citocromo oxidase subunidade I (<i>COI</i>).....	20
5.2.2 Análise filogeográfica	21
5.2.3 Estruturação populacional	24
5.2.3.1 Distribuição de haplótipos e índices de diversidade.....	24
5.2.4 Testes de neutralidade	26
5.2.5 Análise de variância molecular (AMOVA) e índices de diferenciação	26
6. DISCUSSÃO	27
6.1 Padrões citogenéticos	27
6.2 Padrões moleculares	30
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise citogenética de <i>Geophagus brasiliensis</i>	9
Tabela 2: Localidades e tamanho amostral (N) de <i>Geophagus brasiliensis</i> no sudeste brasileiro	15
Tabela 3: Percentual da composição nucleotídica da região do gene mitocondrial <i>citocromo c oxidase subunidade I (COI)</i> em <i>Geophagus brasiliensis</i> nas localidades amostradas	21
Tabela 4: Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações de <i>Geophagus brasiliensis</i> e distribuição de haplótipos	24
Tabela 5: Valores dos testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (F_s) em 14 populações de <i>Geophagus brasiliensis</i>	26
Tabela 6: Análise de variância molecular (AMOVA) de <i>Geophagus brasiliensis</i> em 14 localidades amostradas	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das regiões amostradas de <i>Geophagus brasiliensis</i>	15
Figura 2: Coloração convencional com Giemsa, resultado de NORs, 18S e 5S rDNA das quatro populações de <i>Geophagus brasiliensis</i>	18
Figura 3: Padrões de FISH com a sonda CA ₍₁₅₎ em <i>Geophagus brasiliensis</i>	19
Figura 4: Filogenia obtida com o gene <i>COI</i> das populações de <i>Geophagus brasiliensis</i> de bacias do sudeste brasileiro	23
Figura 5: Rede haplotípica das populações de <i>Geophagus brasiliensis</i> amostradas em 14 localidades	25

RESUMO

NETO, Ariana da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Filogeografia cariotípica e molecular de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) (Perciformes: Cichlidae) nas bacias do sudeste brasileiro: subsídios para a biogeografia histórica do táxon.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientadora: Manuela Maria Cavalcante Granja

Uma das espécies de ciclídeos que possui ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras é o *Geophagus brasiliensis*, popularmente conhecido como “acará” ou “cará”, ocorrendo nas drenagens costeiras do leste e sul do Brasil e no Uruguai. A primeira descrição cariotípica dessa espécie foi realizada em 1977, desde então, outras populações de diferentes localidades foram analisadas e todas elas mostraram número diploide igual a 48 cromossomos ($2n=48$), entretanto, as morfologias cromossômicas apresentam variações no cariótipo e no número fundamental. A análise cariotípica de *Geophagus brasiliensis* foi realizada em 112 espécimes de quatro populações das bacias do Paraíba do Sul e Itabapoana. Foram usadas as técnicas de coloração convencional com Giemsa, NORs e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com as sondas de rDNA 18S e 5S e com a sonda de DNA repetitivo $CA_{(15)}$. O número diploide foi $2n= 48$ cromossomos, com variação no número fundamental $NF= 52$ ou $NF= 56$. Foram observadas três fórmulas cariotípicas diferentes: $4sm +28st +16a$ foi encontrada na localidade do rio Itabapoana-PCH Calheiros (bacia do Itabapoana); nas localidades rio Preto (bacia do Itabapoana) e rio Pinho (bacia do Paraíba do Sul) foi encontrada a fórmula $4sm+ 18st+ 26a$; e a terceira fórmula cariotípica $8sm +12st +28a$ foi encontrada na localidade rio São Francisco do Glória (bacia do rio Paraíba do Sul). O número de NORs teve variação intrapopulacional, predominando indivíduos com marcação em um par cromossômico. A sonda de rDNA 18S confirmou o padrão obtido com o bandeamento NOR, exceto em uma população que o número de marcações de 18S foi menor que o das NORs. A localização da sonda de rDNA 5S manteve-se conservada em todas as amostras. As marcações utilizando a sonda de DNA repetitivo $CA_{(15)}$, no geral, ocorreram nas regiões terminais dos cromossomos, com algumas marcações difusas ao longo dos cromossomos de todas as populações. Os resultados obtidos sugerem que os cariótipos com o primeiro par cromossômico heteromórfico estão restritos à bacia do rio Doce e que a bacia do Paraíba do Sul apresenta três citótipos alopátricos, diferindo no número de cromossomos submetacêntricos e no número de subtlocêntricos/acrocêntricos. As Análises filogenéticas e de máxima

verossimilhança foram realizadas com base em um fragmento do gene *COI*. As hipóteses filogenética indicou a existência de dois haplogrupos (I e II) com bom suporte estatístico, e um terceiro haplogrupo (III), com baixo suporte. O haplogrupo I reuniu as populações das localidades das bacias dos rios Doce, Paraíba do Sul, Itabapoana e São Francisco. O haplogrupo II reuniu os espécimes do rio Mucuri e da bacia do Rio Doce. O haplogrupo III foi exclusivamente formado por amostras da bacia do Paraíba do Sul. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que ocorre mais variação entre as populações dentro das bacias, do que dentro de cada população, com um valor de Fct não significativo de variabilidade entre as bacias. Com base nestes resultados, observa-se que a distribuição de *G. brasiliensis* nas bacias costeiras do sudeste brasileiro envolveu mais dispersão e menos vicariância do que uma espécie obrigatória de água doce, como *Hoplias malabaricus*.

ABSTRACT

NETO, Ariana da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Karyotype and molecular phylogeography of *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) (Perciformes: Cichlidae) in the southeastern Brazilian basins: subsidies for the historical biogeography of the taxon.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-adviser: Manuela Maria Cavalcante Granja.

One of the species of cichlids that is widely distributed in Brazilian watersheds is *Geophagus brasiliensis*, popularly known as "acará" or "cará", occurring in the coastal drains of the east and south of Brazil and Uruguay. The first karyotypic description of this species was carried out in 1977, since then, other populations from different localities were analyzed and all showed a diploid number equal to 48 chromosomes ($2n = 48$), however, chromosomal morphologies have variations in karyotype and fundamental number. The karyotypic analysis of *Geophagus brasiliensis* was carried out on 112 specimens from four populations of the Paraíba do Sul and Itabapoana basins. Conventional staining techniques with Giemsa, NORs and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used with the 18S and 5S rDNA probes and with the CA (15) repetitive DNA probe. The diploid number was $2n = 48$ chromosomes, with a variation in the fundamental number $NF = 52$ or $NF = 56$. Three different karyotype formulas were observed: $4sm + 28st + 16a$ was found in the Itabapoana-Calhs PCH (Itabapoana basin); in the localities of Rio Preto (Itabapoana basin) and Pinho river (Paraíba do Sul basin) was found the formula $4sm + 18st + 26a$; and the third karyotypic formula $8sm + 12st + 28a$ was found in the São Francisco do Glória river basin (Paraíba do Sul river basin). The number of NORs had intrapopulation variation, predominantly individuals with marking on a chromosomal pair. The 18S rDNA probe confirmed the pattern obtained with the NOR banding, except in a population that the number of 18S tags was lower than that of the NORs. The location of the 5S rDNA probe remained conserved in all samples. The markings using the repetitive DNA probe $CA_{(15)}$, in general, occurred in the terminal regions of the chromosomes, with diffuse markings along the chromosomes of all populations. The results obtained suggest that the karyotypes with the first heteromorphic chromosome pair are restricted to the Doce river basin and that the Paraíba do Sul basin presents three allopatric cytotypes, differing in the number of submetacentric chromosomes and in the number of subtelocentric /acrocentric. Bayesian and maximum likelihood analyzes were performed based on a fragment of the *COI* gene. The phylogenetic tree indicated the existence of two haplogroups (I and II) with good

statistical support, and a third haplogroup (III), with low support. Haplogroup I gathered populations from the localities of Doce, Paraíba do Sul, Itabapoana and São Francisco river basins. Haplogroup II collected the specimens of the Mucuri river and the river Doce basin. Haplogroup III was exclusively composed of samples from the Paraíba do Sul basin. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there is more variation among the populations within the basins, than within each population, with a value of F_{ct} no significant variability between the basins. Based on these results, it is observed that the distribution of *G. brasiliensis* in the coastal basins of southeastern Brazil involved more dispersion and less vicariance than a mandatory freshwater species, such as *Hoplias malabaricus*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade de comunidades bióticas, tanto de vegetais quanto de animais, é mais acentuada em baixas latitudes quando comparada a altas latitudes, o que também é válido para espécies de peixes tropicais de água doce ou de água marinha (LOWE-MCCONNELL, 1987). Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos de variabilidade genética e de evolução dentre os vertebrados, uma vez que ocupam uma posição basal na filogenia dos Vertebrata (NELSON et al., 2016).

A região neotropical apresenta a maior diversidade de peixes do mundo e é única no sentido de que a sua maior diversidade ocorre em nível específico ou de subpopulações (ALBERT E REIS, 2011). A definição dos fatores que determinaram essa variabilidade são ainda pouco entendidos na região sudeste do Brasil.

Nesta região, os rios Doce, Paraíba do Sul e Itabapoana drenam os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo considerados rios costeiros e integrantes das ecorregiões nordeste da Mata Atlântica, Paraíba do Sul e Sudeste da Mata Atlântica, números 328, 329 e 331 respectivamente (ABELL et al., 2008). Apesar de estarem localizados entre os maiores centros urbano-industriais do país, ainda abrigam biodiversidade relativamente pouco conhecida e característica de bacias periféricas: baixa diversidade de táxons e alto grau de endemismo (ALBERT e REIS, 2011). Dentre as bacias costeiras, a ictiofauna da bacia do rio Doce é um pouco mais conhecida, a qual apresenta uma grande diversidade e os registros atuais indicam a ocorrência de 71 espécies de peixes nativos, 11 ameaçados de extinção e 28 espécies introduzidas (VIEIRA et al., 2010). A bacia do rio Paraíba do Sul conta com mais de 160 espécies de peixes (BIZERRIL e PRIMO 2001). Os registros de peixes para os afluentes em Minas Gerais, na bacia do Paraíba do Sul indicam a presença de 81 espécies pertencentes a 55 gêneros, 29 famílias e nove ordens (TEIXEIRA et al., 2005), sendo que destas, 65 espécies são nativas, 10 estão ameaçadas de extinção e 15 são endêmicas (VIEIRA e RODRIGUES, 2010). No rio Itabapoana, ocorrem 72 espécies, sendo que 27 destas são encontradas exclusivamente nesta bacia (SARMENTO-SOARES e MARTINS-PINHEIRO, 2013).

Com mais de 1300 espécies descritas, a família Cichlidae é uma das mais especiosas famílias de vertebrados e somente as famílias Gobiidae (com 1875 espécies) e Cyprinidae (com 2010 espécies) competem pela posição de família com maior biodiversidade (KULLANDER, 2003). Cichlidae apresenta ampla distribuição, ocorrendo

na América do Sul e Central, partes da Ásia e América do Norte, África (incluindo Madagascar) e Índia (MOYLE e JUNIOR CECH, 2000; KULLANDER, 2003).

Os ciclídeos neotropicais não apresentam a mesma diversidade em relação aos africanos, todavia possuem grandes variações morfológicas, comportamentais e ecológicas (NELSON, 2006). Existem 450 espécies descritas para o neotrópico, mas somente 106 destas espécies já foram citogeneticamente analisadas (FELDBERG et al., 2003). Uma das espécies de ciclídeos que possui ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras é o *Geophagus brasiliensis*, popularmente conhecido como “acará” ou “cará”, ocorrendo nas drenagens costeiras do leste e sul do Brasil e no Uruguai (KULLANDER, 2003).

A primeira descrição cariotípica dessa espécie foi realizada por MICHELE e TAKAHASHI (1977). Desde então, outras populações de diferentes localidades foram analisadas e todas elas mostraram número diploide igual a 48 cromossomos ($2n=48$), entretanto, as morfologias cromossômicas apresentaram variações no cariótipo e no número fundamental (50, 51, 52, 54 e 56) (THOMPSON, 1979; MICHELE e TAKAHASHI, 1977; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a; MARTINS et al., 1995; VICARI et al., 2006; PIRES et al., 2008; PERAZZO et al., 2013; ALVES-SILVA e DERGAM, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Sistemas de identificação molecular de espécies tornaram-se eficientes com os avanços da biologia molecular (AVISE, 2004). O uso de DNA *barcoding* emergiu recentemente como uma maneira de identificar espécies a partir de um fragmento do gene da citocromo oxidase subunidade I *COI* (HEBERT et al., 2003). Essa técnica tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (HEBERT et al., 2003, 2004; KERR et al., 2007; WARD et al., 2005; SMITH et al., 2008). O DNA *barcoding* permitiu a identificação correta de 388 espécies de peixes de ordens diferentes (WARD e HOLMES, 2007) e teve o poder discriminatório de identificação de 93% em peixes de água doce e 98% em espécies de peixes marinhos (WARD et al., 2009). Em alguns peixes neotropicais, é complicado compreender os processos de especiação que originaram a diferenciação em espécies, devido à reduzida variabilidade morfológica associada a alguns grupos. Nestes casos, estudos moleculares têm um papel fundamental para esclarecer estes problemas de identificação, pois são capazes de mostrar a diversidade genética presente nesses grupos (e.g. TURNER et al., 2004; SANTOS et al., 2009; PEREIRA et al., 2013).

Segundo HAJIBABAEI et al. (2007), o DNA *Barcoding* pode auxiliar em outros estudos como na filogenia, taxonomia e na genética de populações. Na taxonomia pode ser

rotineiramente utilizado para a identificação de espécimes e contribuir para a investigação de espécies sem definição taxonômica. Em estudos filogenéticos pode ser um ótimo ponto de partida para a seleção de táxons com ambiguidades filogenéticas e a utilização das sequências depositadas no banco de dados do *Barcoding* pode ser utilizada para construção de árvores filogenéticas. Já em genética de populações pode oferecer o primeiro sinal de divergências populacionais e facilitar o estudo comparativo da diversidade populacional de muitas espécies.

A filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE et al., 1987). Como o próprio nome indica, a filogeografia lida não somente com as relações filogenéticas entre os táxons estudados, mas com os componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens. Para que se tenha uma melhor compreensão da biogeografia histórica de *Geophagus brasiliensis* no sudeste do Brasil, são necessários estudos que possam complementar aos resultados encontrados para essa região até o momento. Assim, este trabalho tem como objetivos a realização de estudos cariotípicos nas bacias do rio Paraíba do Sul e do rio Itabapoana, complementando esta análise com uma população da bacia do rio Doce, bem como uma análise filogeográfica preliminar utilizando o gene *COI* nesta região.

REFERÊNCIAS

- ABELL, R., THIEME M. L., REVENGA, C., BRYER, M., KOTTELAT, M., BOGUTSKAYA, N., COAD, B., MANDRAK, N., BALDERAS, S. C., BUSSING, W., STIASSNY, M. L. J., SKELTON, P., ALLEN, G. R., UNMACK, P., NASEKA, A., NG, R., SINDORF, N., ROBERTSON, J., ARMIJO, E., HIGGINS, J. V., HEIBEL, T. J., WIKRAMANAYAKE, E., OLSON, D., LÓPEZ, H. L., REIS R. E., LUNDBERG, J. G., PÉREZ, M. H. S., PETRY, P. (2008). Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, v. 58, n. 5, p. 403–414.
- ALBERT, J. S. e REIS, R. E. (2011). *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press, p. 407.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A. e SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* v.18:1, p. 489-522.
- AVISE, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA, p. 684.
- BIZERRIL, C. R. S. F. e PRIMO, P. B. S. (2001). Peixes de Águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR - SEMADS p. 417
- FELDBERG, E., PORTO, J.I.R., e BERTOLLO, L. A. C. (2003). Chromosomal changes and adaptation of Cichlidae fishes during evolution. In: Val A.L. e Kapoor B.G. (eds.). *Fish Adaptation*. New Delhi e New York, Science Publishers, p. 258-308.
- HAJIBABAEI, M., SMITH, M. A., JANZEN, D. H., RODRIGUEZ, J. J., WHITFIELD, J. B. et al. (2007). A minima list barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* v. 6, p. 959–964.
- HEBERT, P. D. N. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* v. 270, p. 313–321.
- HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S. e FRANCIS, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* v. 2, p. 1657–1663.
- KERR, K. C. R., STOECKLE, M. Y., DOVE, C. J., WEIGT, L. A., FRANCIS, C. M., e HEBERT, P. D. N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, v. 7(4), p. 535–543.
- KULLANDER, S. O. (2003). Family Cichlidae. In: Reis R.E., Kullander S.O. e Ferraris-Jr C.J. (Eds). *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucs, p. 605-655.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. T. *ecology*. v. 4, n. 2, p. 11–12, 1987.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. T. (1987). *Ecological studies in tropical fish communities*. *Ecology* v. 4, n. 2, p. 11–12.
- MOYLE, P. B, e CECH, J. J, (2000). *Fishes : an introduction to ichthyology* (4th ed).

Prentice Hall, Uppersaddle River, NJ.

MICHELE, J. L., TAKAHASHI, C. S. (1977). Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). *Cytologia* v. 42, p. 535–537.

NELSON, J. S., GRANDE, T. C., WILSON, M. V. H. (1984). *Fishes of the World*. 2 Ed. New York: John Wiley e Sons.

NELSON, J. S (2006). *Fishes of the World*. 3 Ed. United Status of America: John Wiley e Sons.

OLIVEIRA, I. A., ARGOLO, L. A., BITENCOURT, J. A., DINIZ, D., VICARRI, M. R., AFONSO, P.R. A. M. (2016). Cryptic chromosomal diversity in the complex "*Geophagus brasiliensis*" (Perciformes, Cichlidae). *Zebrafish*, v. 13, p. 33–44.

PEREIRA, T., SANTOS, U., SCHAEFER, C. E., SOUZA, G. O., PAIVA, S. R., MALABARBA, L. R., SCHMIDT, E. E. e DERGAM, J. A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography* v. 40, p. 905–914.

SANTOS, U., VOLCKER, C. M., BELEI, F. A., CIOFFI, M. B., L. A. C. BERTOLLO, L. A. C., PAIVA S. R. e DERGAM, J. A. (2009). Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, v.75, p. 2326-2343.

SARMENTO-SOARES, L. M., MARTINS-PINHEIRO, R. F. (2013). A fauna de peixes nas bacias do sul do Espírito Santo , Brasil. *Papavero*, p. 1–37.

SMITH, W. L., CHAKRABARTY, P., SPARK, J. S. (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae:Cichlinae). *Cladistics* v. 24, p. 625–641.

TEIXEIRA, T. P., PINTO, B. C. T., TERRA, B. F., ESTILIANO, E. O., GRACIA, D. e ARAÚJO, F.G. (2005). Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Série Zoologia* v. 95(4), p. 347-357.

TURNER, T. F., McPHEE, M.V., CAMPBELL, P., WINEMILLER, K. O. (2004). Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. *Journal of Fish Biology*, v. 64, p. 186-201.

VICARI, M. R., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO, O. e BERTOLLO, L. A. C. (2006). Basic and Molecular Cytogenetics in Freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic Conservatorism and Divergence. *Caryologia*, v. 59, p. 260-266.

VIEIRA, F., ALVES, C. B. M., POMPEU, P. S. (2010). Diagnóstico do conhecimento de vertebrados: peixes. In: DRUMMOND, G.M. et. al. (Org.). *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais subsídio ao Programa Biota Minas*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 181-219.

VIEIRA, F. e RODRIGUES, R. R. (2009/2010). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. In: DRUMMOND, G.M. et. al. (Org.). *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de*

Minas Gerais subsídio ao Programa Biota Minas. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 05-22.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. e HEBERT, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* v. 360, p. 1847–1857.

WARD, R. D. e HOLMES, B. H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome *c* oxidase I (*coxI*) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, v.7, p. 899–907.

WARD, R. D (2009). DNA Barcoding: DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* v. 9, p. 1077–1085.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Caracterizar citogenética e molecularmente populações de *Geophagus brasiliensis* das bacias do Paraíba do Sul e do Itabapoana, obtendo dados comparativos com os resultados encontrados por ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e OLIVEIRA et al., (2016), visando assim, ampliar o conhecimento para o estudo da variação biogeográfica cromossômica na espécie.

2.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar citogeneticamente as populações das bacias dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana utilizando dados relativos ao cariótipo, região organizadora de nucléolos e hibridização *in situ* fluorescente com as sondas ribossômicas 18S e 5S rDNA;
- Analisar as marcações da sonda de DNA repetitivo CA₍₁₅₎ em uma população estudada por ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e comparar com as marcações das populações das duas bacias mais ao sul da bacia do Rio Doce coletadas no presente trabalho;
- Estimar a distribuição geográfica dos haplótipos de quatorze populações de *G. brasiliensis* pela análise filogenética do gene mitocondrial *COI*;
- Comparar os dados citogenéticos e moleculares das populações de *Geophagus brasiliensis* do presente trabalho com os das bacias dos rios Doce analisadas por ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e OLIVEIRA et al., (2016) das bacias do Recôncavo Sul, do Rio Contas e Uma Almada.

ARTIGO

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) (TELEOSTEI: CICHLIDAE) NO SUDESTE BRASILEIRO

3. INTRODUÇÃO

A família Cichlidae, com cerca de 450 representantes na ictiofauna neotropical (NELSON, 2006), possui espécies de interesse para estudos evolutivos, pois algumas apresentam ampla distribuição bem como enorme plasticidade morfológica, assumindo um leque de formas que os torna um sistema ideal para testar os fatores que são à base da diversidade morfológica (ALBERTSON e KOCHER, 2006). Na região Neotropical, estudos com espécies do gênero *Gymnogeophagus* têm sido utilizados para teste de hipóteses relacionadas com a evolução dos sistemas de cuidado parental (WIMBERGER et al., 1998). Da mesma forma, a combinação de dados citogenéticos e moleculares podem contribuir para a caracterização de espécies novas (PEREIRA et al., 2013) e aspectos biogeográficos históricos das espécies da região.

Geophagus brasiliensis é uma espécie de ciclídeo de ampla distribuição que ocorre nas drenagens costeiras do leste e sul do Brasil e Uruguai, sendo encontrado na região Sul e Sudeste do Brasil e em vários biomas aquáticos (FROESE e PAULY, 2017). Em alguns casos, podem ocorrer diferenças morfológicas tão marcantes entre suas populações, a ponto de se sugerir a existência de diferentes espécies (MARTINS et al., 1995; BRUM e GALETTI, 1997). BRUM et al., (1998) sugerem, com base em dados citogenéticos, um provável complexo de espécies neste grupo, o que é corroborado por análises que demonstram uma variação na estrutura do cariótipo, envolvendo principalmente o número fundamental cromossômico ($NF=50-56$), já que o número diploide ($2n= 48$) é conservado em todas as populações analisadas (revisado em OLIVEIRA et al., 2016). Da mesma forma, outras espécies de ampla distribuição, como *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1894) e *Astyanax bimaculatus* (LINNEAUS, 1758), apresentam extensa variação cromossômica e são considerados como complexo de espécies ou paraespécies (sensu ALBERT e REIS, 2011).

Apesar dos avanços da citogenética em peixes, os estudos usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) no complexo “*Geophagus brasiliensis*” ainda são escassos. Sabe-se que as sondas de rDNA 18S variam de dois até seis cromossomos marcados, coincidindo parcialmente com as marcações encontradas pela NORs, e os sítios

de rDNA 5S estão localizados na posição intersticial de apenas um par de cromossomos em todas as populações analisadas (tabela 1).

Tabela 1: Análise citogenética de *Geophagus brasiliensis*, incluindo número diploide ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF), número de cromossomos portadores da NORs, distribuição de heterocromatina (banda C); sondas de rDNA 18S e 5S, indicam o número de cromossomos marcados pelo FISH usando. Atualizado de OLIVEIRA et al., 2016.

Localidade	$2n$	Cariótipo	NF	NORs	Banda c	18S	5S	Referência
Ribeirão Preto(SP, Sudeste Brasil)	48	3 m/sm + 45 st/a	51	-	-	-	-	MICHELE e TAKAHASHI, 1977.
Desconhecida	48	4 m/sm + 44 st/a	52	-	-	-	-	THOMPSON, 1979.
Brotas (SP, Sudeste, Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	-	-	-	FELDBERG e BERTOLLO, 1985 a e b.
São Carlos (SP, Sudeste Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	-	-	-	FELDBERG e BERTOLLO, 1985 a e b.
Pirassununga (SP, Sudeste Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	-	-	-	FELDBERG e BERTOLLO, 1985 a e b.
Registro (SP, Sudeste Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	-	-	-	FELDBERG e BERTOLLO, 1985 a e b.
Rio Pirapó, bacia Rio Paranapanema (PR, Sul Brasil)	48	8 m/sm + 40 st/a	56	2 ^a	p	-	-	MARTINS, PORTELA CASTRO, JULIO, 1995.
Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ, Sudeste Brasil)	48	8 m/sm + 40 st/a	56	2 ^a	p	-	-	BRUM et al., 1998.
Lagoa Maricá (RJ, Sudeste Brasil)	48	6 m/sm + 42 st/a	54	2	p	-	-	BRUM et al., 1998.
Rio Jaguariava, bacia Rio	48	6 m/sm + 42 st/a	54	2	p	2 ^a	2	VICARI et al., 2006.

Paranapanema (PR, Sul Brasil)								
Sacovão e Rio Verde, bacia Rio Tibagi (PR, Sul Brasil)	48	6 m/sm + 42 st/a	54	2	p	2 ^a	2	VICARI et al., 2006.
Rio Cambezinho, bacia Rio Tibagi (PR, Sul Brasil)	48	4 m/sm + 44 st/a	52	2	p	2	-	PIRES, CAETANO e DIAS, 2008.
Córrego Três Bocas, bacia Rio Tibagi (PR, Sul Brasil)	48	4 m/sm + 44 st/a	52	2 ^a	p	2 ^a	-	PIRES, CAETANO e DIAS, 2008.
Feijão e córrego Pântano, bacia Paraná (PR, Sul Brasil)	48	6 m/sm + 42 st/a	54	2	p	2	2	NETO et al., 2010.
Saco da Alemoa e Gasômetro (RS, Sul Brasil)	48	4 m/sm + 44 st/a	52	2 ^a	p	-	-	PIRES, CAETANO e DIAS, 2010.
Córrego Olaria e córrego Araquá, Rio Bonito e Rio	48	2 m/sm + 46 st/a	50	-	-	-	-	POLETTO et al., 2010 e POLETTO et al., 2012.
Paraitinguinha (SP, Sudeste Brasil)								
Lagoa Polegar (RS, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a 4 m/sm + 44 st/a 6 m/sm + 42 st/a	50/52/54	2 ^a	p	2	2	PERAZZO et al., 2013.
Arraial (RS, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a 4 m/sm +	50/52/54	-	-	-	-	PERAZZO et al., 2013.

			44 st/a					
			6 m/sm + 42 st/a					
São Gonçalo (RS, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	p	2	2	PERAZZO et al., 2013.
Lagoa Peixe (RS, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50	2	p	2	2	PERAZZO et al., 2013.
Lagoa Quadros (RS, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50/54	2	p	2	2	PERAZZO et al., 2013.
			6 m/sm + 42 st/a					
Parque Ecológico Costa (PR, Sul Brasil)	48	2 m/sm + 46 st/a	50/52/5 4	2	p	2	2	PERAZZO et al., 2013.
			4 m/sm + 44 st/a					
			6 m/sm + 42 st/a					
Reservatório Candonga (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a	50/51/5 2	2-4	p	5	2	ALVES- SILVA e DERGAM, 2015.
			2sm+ 20st+ 26a					
			4sm+ 18st+ 26t					
Corrégo Latão (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a	50/51/5 2	3	p	4	2	ALVES- SILVA e DERGAM, 2015.
			2sm+ 20st+ 26a					
			4sm+ 18st+ 26t					
Lagoa Aguapé (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a	50/51/5 2	3-5	p	6	2	ALVES- SILVA e DERGAM, 2015.
			2sm+ 20st+ 26a					
			4sm+ 18st+ 26t					
Lagoa Cristal (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a	50/51/5 2	2	p	2	2	ALVES- SILVA e DERGAM, 2015.
			2sm+ 20st+ 26a					
			4sm+ 18st+					

			26t					
Lagoa Linguiça (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a 2sm+ 20st+ 26a 4sm+ 18st+ 26t	50/51/5 2	2-4	p	4	2	ALVES-SILVA e DERGAM, 2015.
Rio Santo Antônio (MG, Sudeste Brasil)	48	3sm+ 18st+ 27a 2sm+ 20st+ 26a 4sm+ 18st+ 26t	50/51/5 2	2-3	p	4	2	ALVES-SILVA e DERGAM, 2015.
Rio Mineiro, bacia Recôncavo Sul (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	5	p	5	2	OLIVEIRA et al., 2016.
Rio Contas, bacia do rio Contas (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	2	p	2	2	OLIVEIRA et al., 2016.
Rio Pedras, bacia do rio Contas (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	3	p	6	2	OLIVEIRA et al., 2016.
Rio Preto do Costa, bacia do rio Contas (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	5	p	5	2	OLIVEIRA et al., 2016.
Rio Preto do Criciúma, bacia do rio Contas (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	4	p	3	2	OLIVEIRA et al., 2016.
Rio Oricó, bacia do rio Contas (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	2	p	2	2	OLIVEIRA et al., 2016.

Rio São Pedro, bacia do Uma- Almada (BA, Nordeste Brasil)	48	2m/sm+ 46st/a	50	2	p	3	2	OLIVEIRA et al., 2016.
---	----	------------------	----	---	---	---	---	------------------------

O sobrescrito a indica presença de heteromorfismo dentro do par de cromossomos portadores de NOR; NF: número fundamental; P: bandas pericentroméricas.

No sudeste brasileiro, as análises moleculares e citogenéticas realizadas nesta espécie foram realizadas por ALVES-SILVA e DERGAM (2015); a topologia da árvore em *G. brasiliensis* obtida pelo método bayesiano, com base na variação do gene *COI*, não foi correlacionada com o polimorfismo encontrado no primeiro par cromossômico do cariótipo, mas permitiu a identificação de três haplogrupos, mostrando que a bacia do Rio Doce está parcialmente isolada da bacia do Paraíba do Sul.

A fim de obter um panorama mais abrangente da região Sudeste do Brasil sobre a divergência cariotípica e filogeográfica dessa espécie, este trabalho teve como objetivo analisar citogenética e molecularmente, *G. brasiliensis* em quatro populações distribuídas nas bacias dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécimes e preparação cromossômica

As análises citogenéticas foram realizadas em 112 espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados no Rio São Francisco do Glória, no rio Pinho, no rio Preto, no rio Itabapoana e Rio Doce (Tabela 2, Figura 1). No laboratório, os peixes receberam uma dose aquosa de colchicina 0,0125%, na relação de 10mg por 100 g de peso. Foram então anestesiados e eutanasiados com solução aquosa de óleo de cravo na concentração de 300 mg.L⁻¹ (LUCENA et al., 2013), conforme aprovado pela autorização número 051/2016 do Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa. As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior utilizando o método convencional de BERTOLLO et al. (1978) (Anexo 1). Os seguintes padrões citogenéticos foram realizados: coloração convencional com giemsa, identificação das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação por nitrato de prata (NORs) (HOWELL e BLACK, 1980), hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com as sondas 18S e 5S rDNA (HATANAKA e GALETTI Jr 2004), bem como com as sondas de DNA repetitivo CA₍₁₅₎, GA₍₁₅₎, CAT₍₁₅₎, GC₍₁₅₎ e AT₍₁₅₎ (PINKEL et al., 1986) (Anexo 1). Para marcação das sondas ribossomais foi utilizado o procedimento de *nick-translation* com uso do kit Nick Translation Digoxigenin

(Roche) de acordo com as recomendações do fabricante, a detecção da sonda foi feita com a anti-digoxigenin rhodamine (Roche), e as sondas repetitivas foram comercialmente marcadas em sua extremidade 5' com o fluoróforo Cy₃ (Sigma).

As metáfases com melhor morfologia cromossômica foram capturadas digitalmente em microscópio Olympus BX53F com câmeras Olympus DP73 e MX 10, para técnicas clássicas e fluorescentes respectivamente; utilizando o sistema CellSens (Olympus Corp.). Os cariótipos foram medidos com auxílio do software Image-Pro Plus® e classificados seguindo a razão de braços (RB) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) segundo LEVAN et al. (1964) com modificações, considerando como acrocêntricos apenas aqueles cromossomos sem braço maior visível. Seguindo ALVES-SILVA e DERGAM (2015), os cromossomos que apresentaram um segmento visível de braço foram considerados subtelocêntricos. Este critério visual permitiu um grau maior de resolução e foi também utilizado para reinterpretar resultados já publicados. Para cálculo do Número Fundamental de braços (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) foram considerados de dois braços, enquanto os subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) constituídos por um único braço. A identificação dos pares de homólogos nas preparações de FISH foi feita com base em imagens coradas com coloração convencional (Giemsa).

Tabela 2: Áreas e número de espécimes amostrados (N) de *Geophagus brasiliensis* no sudeste brasileiro.

Bacia	Rio/Localidade	N	GPS
Paraíba do Sul	rio São Francisco do Glória/ Muriaé-MG	28	20°81'20,13" S/ 42°32'34,38" W
	rio Pinho/ Santos Dumont-MG	10	21°47'52,27" S/ 43°46'48,68" W
Itabapoana	rio Preto/ Espera Feliz-MG	13	20°74'66,35" S/ 41°87'40,17" W
	rio Itabapoana- PCH Calheiros/Bom Jesus de Itabapoana-RJ	46	20°99'96,19" S/ 43°46'48,68" W
Rio Doce	rio Santo Antônio/Ferros-MG	10	19°13'55,05" S/ 43°01'16,21" W

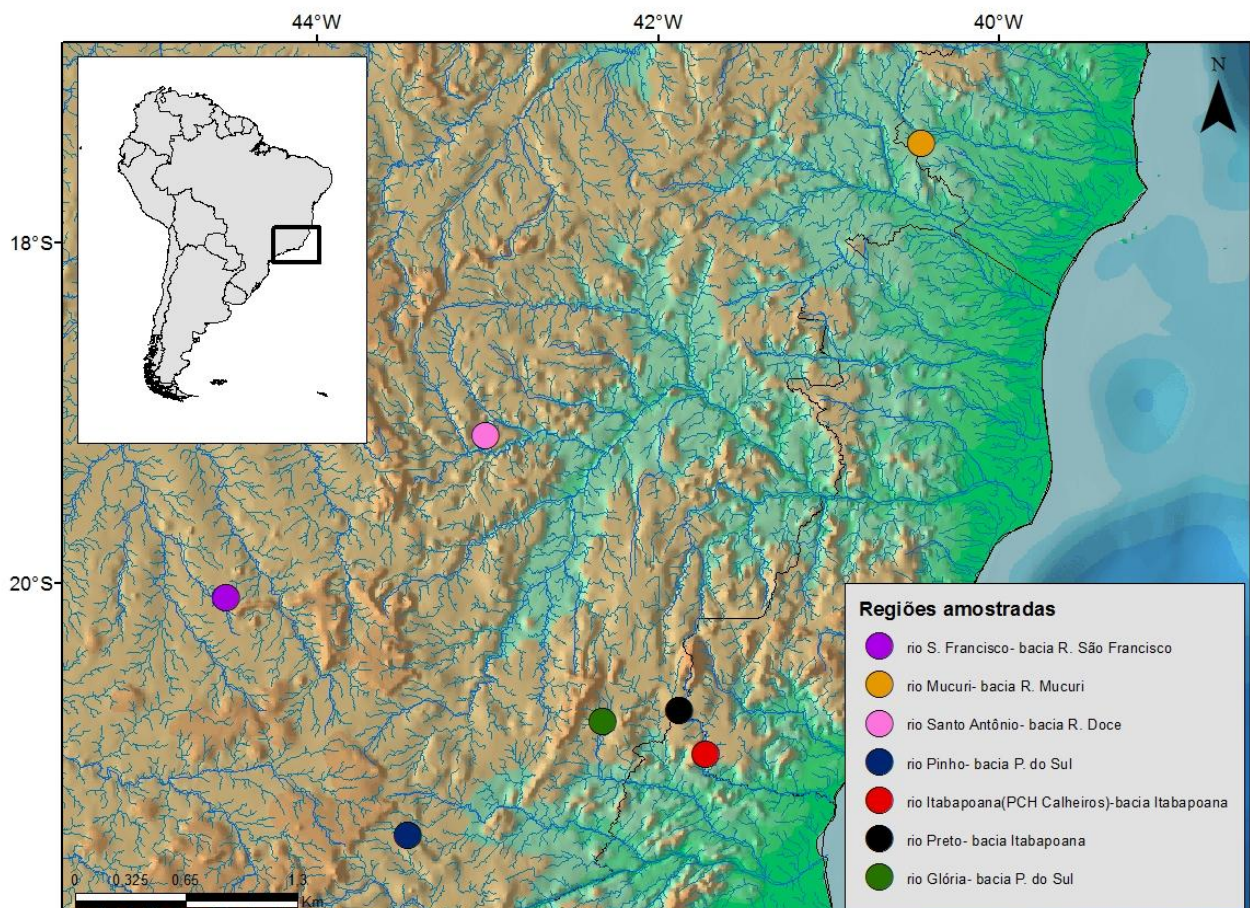


Figura 1: Mapa das regiões amostradas de *Geophagus brasiliensis* no sudeste brasileiro.

4.2 Procedimentos/ Técnicas Moleculares

Para estudar o padrão da diversidade genética nas populações de *G. brasiliensis* das bacias amostradas, foram obtidas sequências nucleotídicas da região do gene da citocromo

oxidase I (*COI*) do DNA mitocondrial de 26 espécimes de quatro localidades, em seguida foram incluídas 36 sequências obtidas no trabalho de ALVES-SILVA e DERGAM (2015), sendo seis sequências retiradas do Genbank, totalizando 61 espécimes de *G. brasiliensis* provenientes de 14 localidades e um espécie de *Gymnogeophagus meridionalis* utilizado como grupo externo.

4.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos 26 espécimes foi extraído a partir de tecidos de nadadeiras, músculo, fígado e/ou coração, utilizando o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com o protocolo adaptado de DOYLE e DOYLE (1987) (Anexo 1).

4.2.2 Reações de amplificação e sequenciamento dos produtos de PCR

A região mitocondrial *COI* foi amplificada em termociclador Mastercycle Eppendorf™, utilizando os *primers* Fish F1-T1 e Fish R1-T1 (WARD et al., 2005). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25,0 µL [19,1 µL de H₂O; 2,5 µL de tampão IIIB (100 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 100 mM KCl; 1% Triton X-100), 0,25 µL dNTPs (20 mM), 0,45 µL de cada primer (10µM), 0,25 µL (2.5 U) de Taq polimerase (Phoneutria) e 2µL de DNA (100 ng/µl)]. Cada um dos 35 ciclos de reação teve as seguintes temperaturas: desnaturação 94 °C por 2 minutos e 30 segundos, anelamento 47 °C por 30 segundos e extensão 72 °C por 45 segundos, com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos e um passo de extensão final de 72 °C por 10 min. O produto amplificado foi purificado por precipitação salina (PEG 8000) (20% polyethyleneglycol, 2,5 M NaCl) e sequenciado pela Macrogen (Korea).

4.2.3 Alinhamento das sequências e análises

As sequências foram alinhadas com MUSCLE (EDGAR, 2004) implementado no software MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016). A inferência filogenética (MB) foi realizada com o software MrBayes versão 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012) com quatro cadeias independentes de Markov Monte Carlo (MCMC) de 10.000.000 gerações cada um, com uma árvore filogenética amostrados a cada 10.000 gerações. Vinte e cinco por cento das árvores iniciais foram descartadas com burn-in e as árvores restantes foram usadas para gerar estatísticas e topologia. O suporte estatístico foi obtido na forma de probabilidade posterior; o melhor modelo de evolução molecular foi definido com base no critério de informação de *Akaike Information Criterion* (AIC) em software Partition Finder v 1.1.1 (LANFEAR et al., 2012). A análise de máxima verossimilhança (MV) foi realizada com o software Iq-Tree 1.5.3 (TRIFINOPOULOS et al., 2016). O sinal filogenético foi estimado

usando 1000 pseudorreplikações de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). A espécie *Gymnogeophagus meridionalis* foi usada como outgroup nas análises moleculares. Os parâmetros populacionais, de diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e número de haplótipos foram calculados no programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Os sítios polimórficos do gene *COI* foram estimados utilizando o software DnaSP v.5 (LIBRADO e ROZAS, 2009) e a rede de haplótipos construída com o software Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd.) baseada no algoritmo Median Joining (MJ) (BANDELT et al., 1999). O teste de neutralidade Tajima's D (TAJIMA, 1989) e de FU (FU, 1997) foi realizado em software DnaSP v.5 (LIBRADO e ROZAS, 2009) para os haplogrupos observados nas árvores filogenéticas. A análise de variância molecular (AMOVA) considerando os três níveis hierárquicos de diferenciação populacional entre populações, dentro das populações e entre as bacias Fst, Fsc e Fct foi realizada no programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). No presente trabalho, os três níveis são: Fst: entre populações dentro das bacias, Fsc: dentro das populações e Fct: entre as bacias.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados citogenéticos

Todos os espécimes analisados apresentaram $2n=48$ cromossomos, independentemente do sexo. A população de *Geophagus brasiliensis* proveniente da localidade rio Itabapoana-PCH Calheiros (bacia Itabapoana) apresentou o cariótipo $4sm +28st +16a$, enquanto as populações dos rio Preto (bacia Itabapoana) e Pinho (bacia Paraíba do Sul) apresentam o cariótipo $4sm +18st +26a$, sendo assim essas três localidades possuem $NF= 52$. A população da localidade do rio São Francisco do Glória apresentou o cariótipo $8sm +12st +28a$ e $NF= 56$, sem cromossomos sexuais diferenciados em todas as populações (Figura 2). A quantidade das marcações da NORs teve variação intrapopulacional apenas nos espécimes da localidade do rio Pinho, apresentando duas ou três marcações, já nas demais localidades foi encontrada apenas duas marcações em todos os indivíduos (Figura 2 B). Essas marcações ocorreram somente nas regiões terminais dos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos em todas as populações (Figura 2). O FISH com sonda rDNA 18S mostrou a presença de cistrons ribossomais na braço curto de dois cromossomos subtelocêntricos, de forma coincidente com as NORs, exceto em uma localidade que apresentou o número de marcação de 18S menor que o número de NORs (Figura 2). Os sítios de rDNA 5S foram localizados na região intersticial de um par de cromossomos subtelocêntricos, em todos os indivíduos analisados (Figura 2).

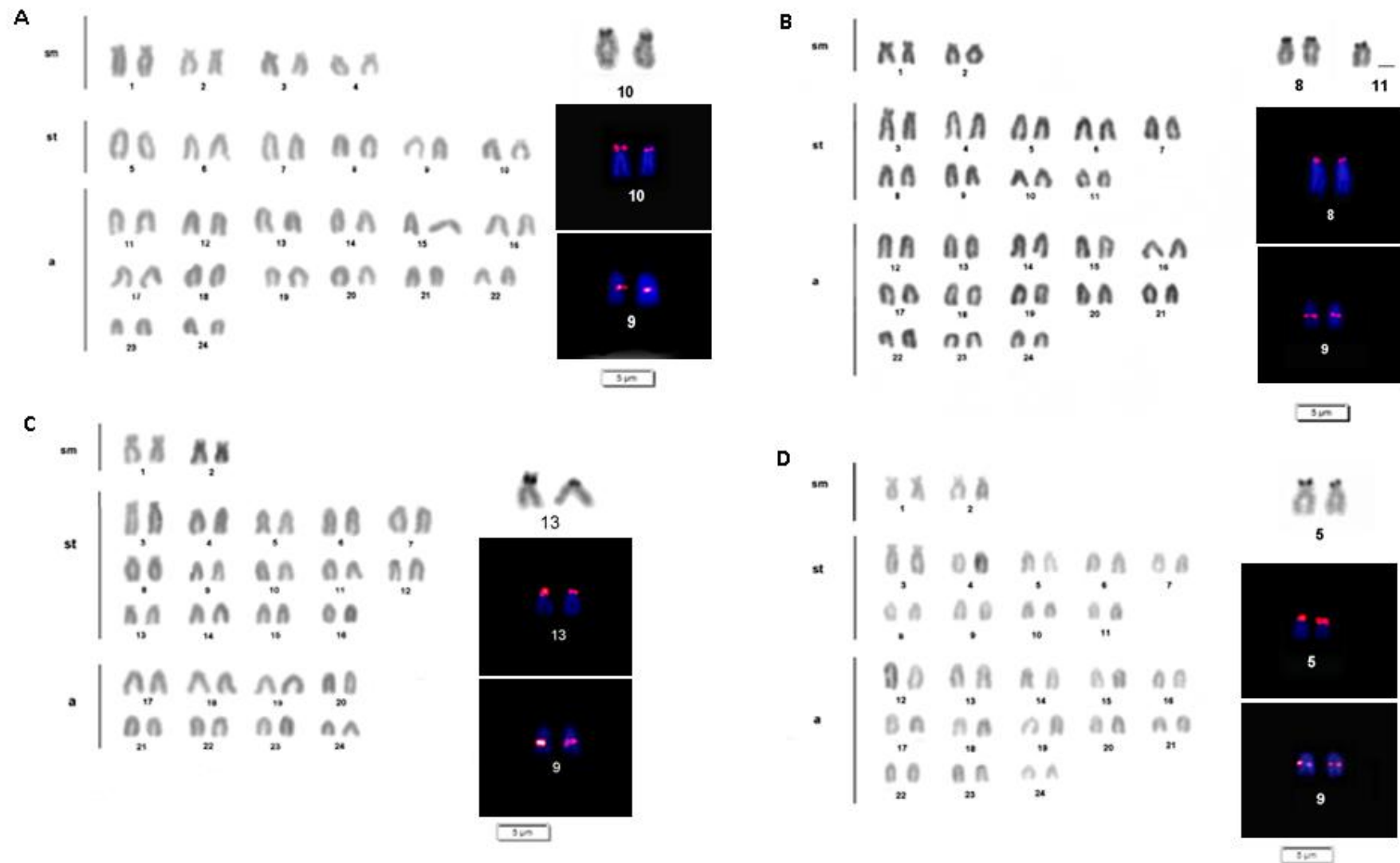


Figura 2: Coloração convencional com Giemsa, resultado de NORs, 18S e 5S rDNA das quatro populações de *Geophagus brasiliensis* (A) rio São Francisco do Glória, (B) rio Pinho, (C) rio Itabapoana- PCH Calheiros e (D) rio Preto. Barra: 5µm.

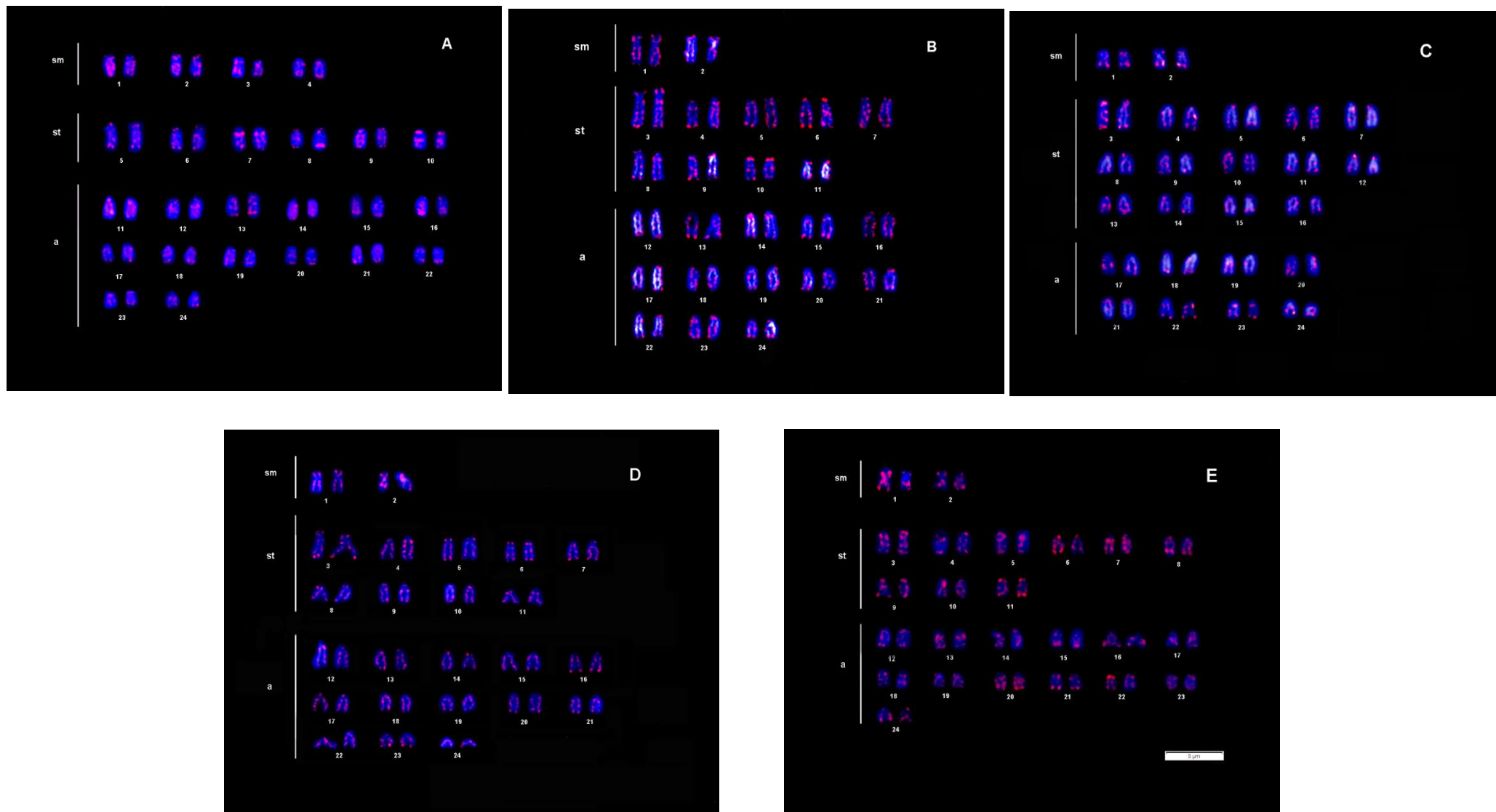


Figura 3: FISH utilizando a sonda $CA_{(15)}$ em *Geophagus brasiliensis* (A) rio São Francisco do Glória, (B) rio Pinho, (C) rio Itabapoana- PCH Calheiros, (D) rio Preto e (E) rio Santo Antônio. Barra: 5 μ m.

Dentre as sondas de microssatélites fluorescentes testadas ($CA_{(15)}$, $GA_{(15)}$, $CAT_{(10)}$, $GC_{(15)}$ e $AT_{(15)}$), apenas a sonda $CA_{(15)}$ deu resultados satisfatórios. Esta sonda apresentou padrões similares em todas as cinco populações analisadas, apresentando marcações nas regiões terminais dos cromossomos, além de exibirem um padrão de marcação difuso ao longo dos mesmos (Figura 3). A população da localidade rio São Francisco do Glória, bacia Paraíba do Sul, possui todos os cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos marcados nas regiões subteloméricas; nos pares 12 e 14 dos cromossomos acrocêntricos, as marcações são mais difusas e as marcações nas regiões subteloméricas são menos evidentes do que nos demais acrocêntricos (Figura 3-A). A população do rio Pinho, bacia Paraíba do Sul e a população do rio Preto, bacia do Itabapoana possuem todos os cromossomos marcados nas regiões subtelomérica, além das marcações difusas ao longo dos cromossomos (Figura 3-B e D). A população do rio Itabapoana-PCH Calheiros, bacia rio Itabapoana possui os cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e os acrocêntricos com as marcações difusas e as regiões terminais marcadas, exceto os pares 7, 11, 17, 20 e 21 que estão marcados apenas em uma das extremidades (Figura 3-C). A população do rio Santo Antônio, bacia do rio Doce, possui um padrão de marcação semelhante ao da população do rio Itabapoana, todos os cromossomos estão com marcações difusas e as regiões terminais marcadas, exceto os pares de cromossomos 15, 17 e 23 (Figura 3-E). Não houve variação intrapopulacional.

5.2 Dados moleculares

5.2.1 Variação do gene citocromo oxidase subunidade I (*COI*)

Foram obtidas 61 sequências de *G. brasiliensis*, as sequências correspondem a subunidade I do gene citocromo oxidase (*COI*). O alinhamento permitiu a utilização de um fragmento de 536 pb. Nas sequências de *G. brasiliensis*, a composição nucleotídica não apresentou variação considerável entre as diferentes localidades (Tabela 4). Os nucleotídeos C e T correspondem cerca de 29% da composição, enquanto que A e G, correspondem a 23% e 17% respectivamente.

Tabela 3: Percentual da composição nucleotídica da região do gene mitocondrial *citocromo c oxidase* subunidade I (COI) em *Geophagus brasiliensis* nas localidades amostradas.

Localidades	C	T	A	G
RP ¹	29,22	29,71	23,38	17,69
RI ¹	29,14	29,79	23,38	17,69
PSGn ²	29,72	30,42	22,4	17,47
PS ²	29,06	29,87	23,54	17,53
RPI ²	29,65	29,55	23,11	17,69
RG ²	29,11	29,82	23,48	17,59
LA ³	29,84	29,11	23,30	17,75
RSA ³	29,38	29,63	23,30	17,69
LC ³	29,71	29,18	23,38	17,74
LL ³	29,71	29,38	23,54	17,37
CL ³	29,55	29,55	23,21	17,69
RPC ³	29,65	29,44	23,00	17,91
RSF ⁴	29,22	29,87	23,05	17,86
RM ⁵	29,55	29,63	23,38	17,45
Máximo	29,84	30,42	23,54	17,91
Mínimo	29,06	29,11	22,4	17,37

¹ Bacia do Itabapoana; ² Bacia do Paraíba do Sul; ³ Bacia do Doce; ⁴ Bacia do São Francisco; ⁵ Bacia do Mucuri, RP – rio Preto, RI– rio Itabapoana-PCH Calheiros, PSGn – Paraíba do Sul GenBank, PS – Paraíba do Sul, RPI – rio Pinho, RG – rio São Francisco do Glória, LA – Lagoa Aguapé, RSA – rio Santo Antônio, LC – Lagoa Cristal, LL – Lagoa Linguíça, CL – Córrego Latão, RPC –rio Piranga-Candongá, RSF – rio São Francisco, RM – rio Mucuri.

5.2.2 Análise filogeográfica

A análise filogeográfica de *G. brasiliensis* foi realizada com base em 61 sequências de 536 pares de bases de comprimento, das 14 localidades amostradas. Na construção da hipótese filogenética (MB), o modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi HKY+G, e para a análise de Máxima Verossimilhança (MV) o melhor modelo foi HKY+G4+F. As topologias resultantes das inferências bayesiana e de máxima

verossimilhança e seus respectivos valores de probabilidade posterior e bootstrap são mostrados na Figura 4.

A filogenia do gene *COI* das amostras de *Geophagus brasiliensis*, somadas às utilizadas por ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e do GenBank, indicou a existência de um haplogrupos (II) com bom suporte estatístico, e dois haplogrupos (I e III), com baixo suporte em ambas as análises (Figura 4). O haplogrupos I reuniu as populações das localidades das bacias dos rios Doce (Córrego Latão, rio Piranga-Candongia, rio Santo Antônio e Lagoa Aguapé), Paraíba do Sul (rios Pinho, São Francisco do Glória e Paraíba do Sul e Paraíba do Sul retiradas do Genbank), Itabapoana (rio Preto e rio Itabapoana-PCH Calheiros) e São Francisco. O haplogrupos II reuniu os espécimes do rio Mucuri e da bacia do Rio Doce (Lagoa Cristal, Linguíça e Aguapé). O haplogrupos III foi exclusivamente formado por amostras da bacia do Paraíba do Sul: parte dos espécimes dos rios Pinho, São Francisco do Glória e Paraíba do Sul, além do restante das amostras do Genbank também procedentes do Paraíba do Sul.

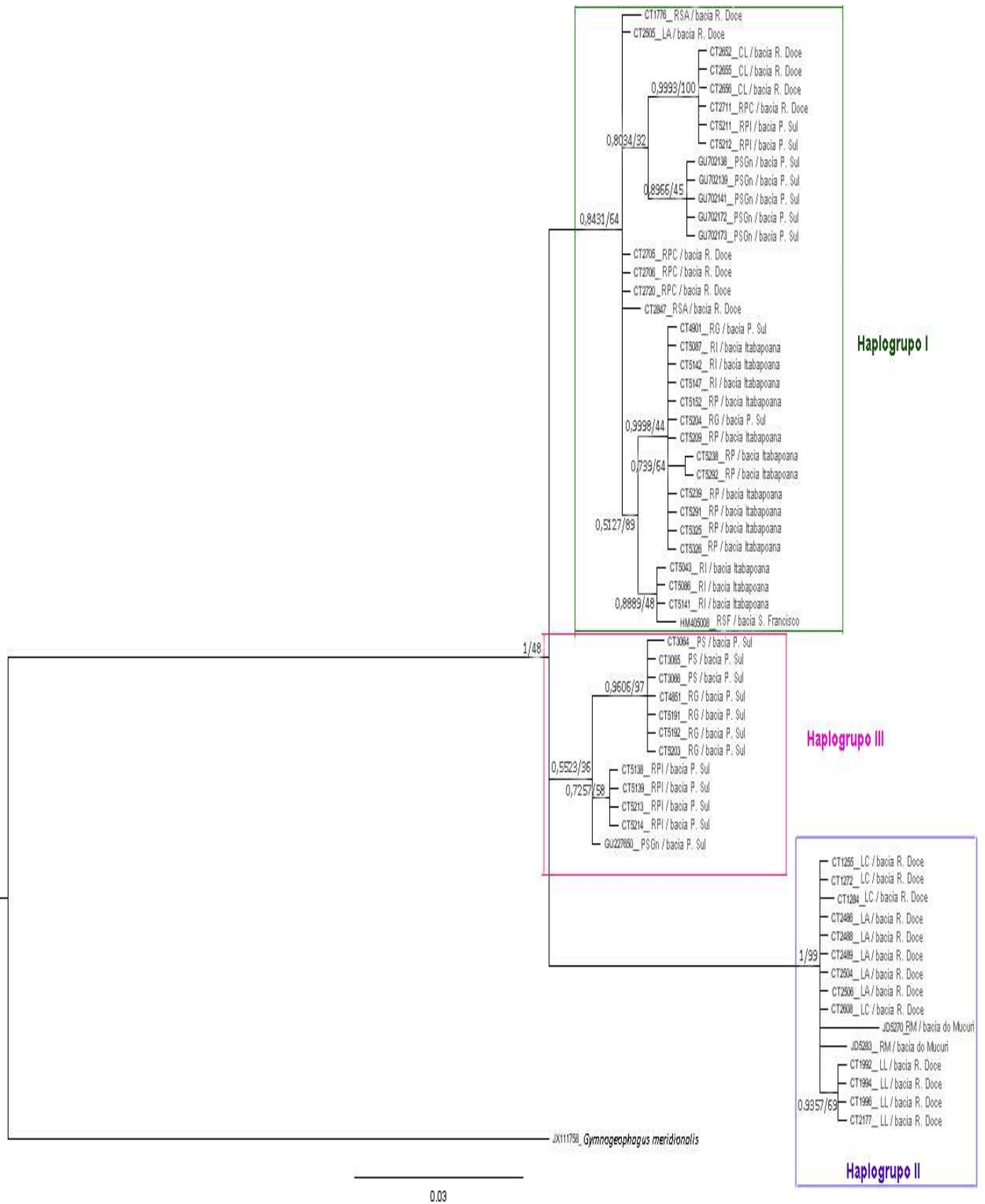


Figura 4: Filogenia obtida com o gene *COI* das populações de *Geophagus brasiliensis* de bacias do sudeste brasileiro. A topologia foi obtida através da análise bayesiana. Os valores

indicam suporte estatístico de probabilidade posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (máxima verossimilhança).

5.2.3 Estruturação populacional

5.2.3.1 Distribuição de haplótipos e índices de diversidade

As 61 sequências de 536 pb da região do gene mitocondrial *COI* apresentaram 16 haplótipos e 108 sítios variáveis (Figura 5). O número de haplótipos por localidade foi em geral, muito baixo, variando entre 1 e 2 por localidade (Tabela 5). As sequências apresentaram diversidade haplotípica (H_d) 0,905 e nucleotídica (π) 0,000904; a diversidade gênica intrapopulacional variou entre 0,0001 (RP, PS, LL e CL) e 1,000 (RSA e RFS) e a diversidade nucleotídica variou entre 0,000 (RP, PS, LL, CL e RSF) e 0,058442 (RSA) (Tabela 5).

Tabela 4: Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações de *Geophagus brasiliensis*, números de indivíduos e de haplótipos obtidos com AMOVA.

Localidades	Nº de indivíduos	Nº de haplótipos e localização	Diversidade gênica (h)	Diversidade nucleotídica (π)
RP ¹	8	1(H2)	0,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000
RI ¹	6	2(H1 e H2)	0,6000 +/- 0,1291	0,000974 +/- 0,001027
PSGn ²	2	2(H9 e H10)	0,3333 +/- 0,2152	0,006908 +/- 0,004634
PS ²	3	1(H4)	0,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000
RPI ²	6	2(H3 e H5)	0,5333 +/- 0,1721	0,000866 +/- 0,000952
RG ²	6	2(H2 e H4)	0,5333 +/- 0,1721	0,001732 +/- 0,001520
LA ³	6	2(H12 e H13)	0,3333 +/- 0,2152	0,007576 +/- 0,004987
RSA ³	2	2(H15 e H11)	1,0000 +/- 0,5000	0,058442 +/- 0,059248
LC ³	4	2(H13 e H16)	0,5000 +/- 0,2652	0,026786 +/- 0,018159
LL ³	4	1(H14)	0,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000
CL ³	3	1(H5)	0,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000
RPC ³	3	2(H5 e H12)	0,6667 +/- 0,3143	0,011905 +/- 0,009572
RSF ⁴	1	1(H8)	1,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000
RM ⁵	2	2(H6 e H7)	1,0000 +/- 0,5000	0,011364 +/- 0,012148
Média	4	1,6	0,4629	0,000904

¹ Bacia do Itabapoana; ² Bacia do Paraíba do Sul; ³ Bacia do Doce; ⁴ Bacia do São Francisco; ⁵ Bacia do Mucuri, RP – rio Preto, RI – rio Itabapoana- PCH Calheiros, PSGn – Paraíba do Sul GenBank, PS – Paraíba

do Sul, RPI – rio Pinho, RG – rio São Francisco do Glória, LA – Lagoa Aguapé, RSA – rio Santo Antônio, LC – Lagoa Cristal, LL – Lagoa Linguíça, CL – Córrego Latão, RC –rio Piranga-Candonga, RSF – rio São Francisco, RM – rio Mucuri.

Dentre os 16 haplótipos (Figura 5), H2 foi o mais comum, encontrado em 13 indivíduos de três localidades das bacias do Itabapoana e do Paraíba do Sul (Tabela 5), seguido pelo haplótipo H5 que ocorreu em 6 espécimes de três localidades diferentes, nas bacias dos rios Doce e do Paraíba do Sul. Os haplótipos H4 (n=7), H12 (n=4) e H13(n=8) compartilham espécimes de duas localidades e os demais haplótipos foram únicos.

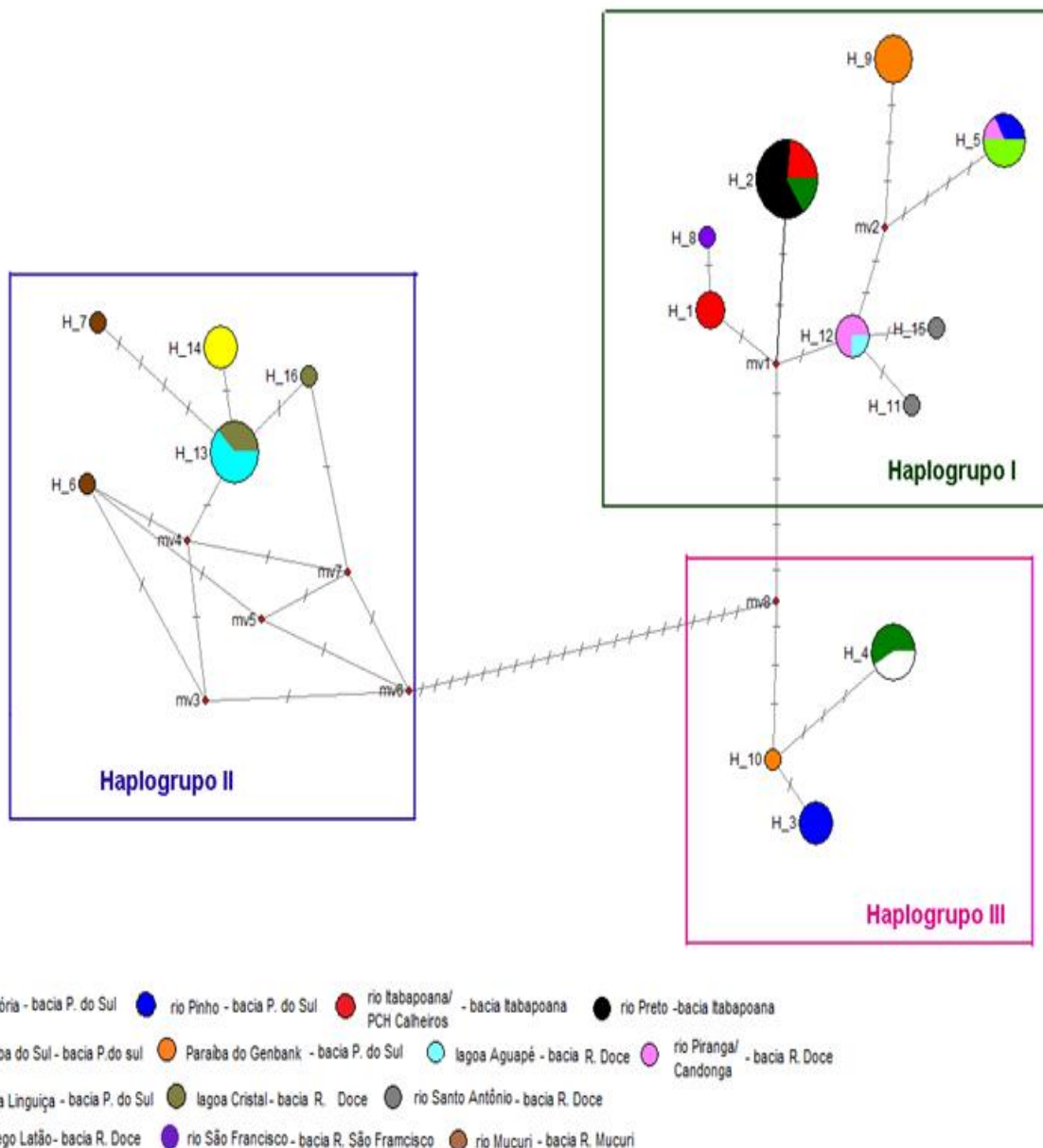


Figura 5: Rede haplotípica das populações de *Geophagus brasiliensis* amostradas em 14 localidades.

5.2.4 Testes de neutralidade

Os testes de Tajima (D) (Tabela 6) tiveram valores iguais à zero na maior parte das localidades; apenas as populações PSGn, LA e LC apresentaram valores negativos. Em relação ao teste de Fu (Fs), todas as populações apresentam valores positivos e maiores que zero (Tabela 6).

Tabela 5: Valores dos testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) em as 14 populações de *Geophagus brasiliensis*. Valores significativos em 5% ($p < 0,05$) sombreados.

Localidades	Nº de haplótipos	Tajima (D)	P	Fu (Fs)	P
RP ¹	1	0,00000	1,00000	-	-
RI ¹	2	1,44510	0,97700	0,79518	0,56400
PSGn ²	2	-1,23311	0,09700	4,82831	0,98300
PS ²	1	0,00000	1,00000	-	-
RPI ²	2	0,85057	0,87100	0,62543	0,47000
RG ²	2	1,03194	0,88200	1,72310	0,757000
LA ³	2	-1,46690	0,01500	5,30432	0,989000
RSA ³	2	0,00000	1,00000	3,58352	0,620000
LC ³	2	-0,86280	0,04600	6,95768	0,990000
LL ³	1	0,00000	1,00000	-	-
CL ³	1	0,00000	1,00000	-	-
RPC ³	2	0,00000	0,70600	3,63466	0,90300
RSF ⁴	1	0,00000	1,00000	-	-
RM ⁵	2	0,00000	1,00000	1,94591	0,55000

¹Bacia do Itabapoana; ² Bacia do Paraíba do Sul; ³ Bacia do Doce; ⁴ Bacia do rio São Francisco; ⁵ Bacia do Mucuri, RP – rio Preto, RI – rio Itabapoana-PCH Calheiros, PSGn – Paraíba do Sul GenBank, PS – Paraíba do Sul, RPI – rio Pinho, RG – rio São Francisco do Glória, LA – Lagoa Aguapé, RSA – rio Santo Antônio, LC – Lagoa Cristal, LL – Lagoa Linguíça, – Córrego Latão, RPC – rio Piranga-Candongia, RSF – rio São Francisco, RM – rio Mucuri.

5.2.5 Análise de variância molecular (AMOVA) e índices de diferenciação

Os resultados da AMOVA foram expressos nos seguintes parâmetros estatísticos: o índice F_{st} estimou a variação das frequências alélicas entre as populações dentro das bacias, F_{sc} estimou a variação dentro das populações e F_{ct} a variação entre as bacias. As

populações variaram mais dentro de cada bacia do que dentro das populações: 64,91% e 11,32% respectivamente (Tabela 7), com alto valor de $F_{ST} = 0,886$ ($p=0,0001$) e $F_{SC} = 0,851$ ($p=0,0001$) e valor não significativo de $F_{CT} = 0,237$ ($p=0,1085$).

Tabela 6: Análise de variância molecular (AMOVA) de *Geophagus brasiliensis* em 14 localidades amostradas (1023 permutações).

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	CV ³	PV ⁴	F _{ST} ⁵	F _{SC} ⁵	F _{CT} ⁵
Entre bacias	3	291,647	3,686 Va	23,77			
Entre populações dentro das bacias	11	446,619	10,065 Vb	64,91	0,886	0,851	0,237
Dentro das populações	46	80,75	1,755 Vc	11,32			
Total	60	819,016	15,507				

¹ Grau de liberdade; ² Soma dos quadrados; ³ Componentes de variância; ⁴ Percentagem de variação; ⁵ Índices de fixação. F_{ST} : entre populações dentro das bacias; F_{SC} : dentro das populações; F_{CT} : entre as bacias.

6. DISCUSSÃO

6.1 Padrões citogenéticos

As populações de *G. brasiliensis* analisadas neste trabalho apresentaram $2n= 48$ cromossomos, correspondendo a uma característica considerada conservada e ancestral na ordem Perciformes e ainda mantida na família Cichlidae (THOMPSON, 1979; FELDBERG et al., 2003). A faixa de variação do NF (52- 56) encontrado nas populações é semelhante ao que já foi descrito em outras populações (Tabela 1). Diversificações do NF sem alteração do número diploide são interpretadas como resultantes de inversões pericentroméricas (WHITE, 1978). O NF 52 foi descrito pela primeira vez por THOMPSON 1979, e foi encontrada depois em populações das bacias rio Tibagi-PR e Rio Doce, e na lagoa Polegar/ Arraial- RS (Tabela 1). Já o NF 56 foi encontrado em populações da bacia Paranapanema-PR e na lagoa Rodrigo de Freitas-RJ (Tabela 1).

A fórmula cromossômica $4sm +28st +16a$ foi encontrada na localidade do rios Itabapoana-PCH Calheiros (bacia do Itabapoana); já nas localidades rio Preto (bacia do Itabapoana) e rio Pinho (bacia do Paraíba do Sul) foi encontrada a fórmula $4sm+ 18st+ 26a$, as quais também já foram descritas em outras populações (Tabela 1). Uma terceira fórmula cariotípica de $8sm +12st +28a$ foi encontrada na localidade rio São Francisco do

Glória (bacia do rio Paraíba do Sul). Esta última é semelhante à observada na localidade-tipo de *G. brasiliensis* proveniente a lagoa Rodrigo de Freitas-RJ (BRUM et al., 1998). Uma outra população com a mesma fórmula cariotípica foi descrita no rio Pirapo, bacia do rio Paranapanema- PR, na bacia do alto Paraná (MARTINS et al., 1995).

Por outro lado, as fórmulas cariotípicas observadas neste estudo na bacia do Paraíba do Sul, diferem da encontrada no trabalho de ALVES-SILVA e DERGAM (2015) no ribeirão Espírito Santo, afluente do Paraibuna (2sm +16st +30a), dentro da mesma bacia. Na bacia do rio Doce, as quatro fórmulas cariotípicas estão associadas a um complexo sistema de polimorfismo cromossômico envolvendo o primeiro par de submetacêntricos, e que não é relacionado ao sexo do espécime nem à localidade (ALVES-SILVA e DERGAM, 2015). No estado da Bahia, as populações de *G. brasiliensis* apresentam três fórmulas cariotípicas: 2sm +16st +30a; 2sm +14 st +32a e 2sm +12st +34a (OLIVEIRA et al., 2016), mas sem o polimorfismo cromossômico observado por ALVES-SILVA E DERGAM (2015) na bacia do rio Doce.

Neste estudo, as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) múltiplas ocorreram apenas em uma espécie do rio Pinho (bacia do Paraíba do Sul), enquanto que as demais populações caracterizaram-se por apresentar duas marcações em um par de cromossomos homólogos (Tabela 3). Essas variações podem ser atribuídas a rearranjos cromossômicos, tais como translocação que pode transpor sequências repetidas da região da NOR em outros cromossomos e assim originar NORs múltiplas (FELDBERG et al., 1985a; FELDBERG et al., 2003), ou ser o resultado de atividades de transposon (CROMBACH & HOGEWEG, 2007) ou ainda, podem ser causadas por ativação de sítios não necessariamente nucleolares na última interfase celular (SUMNER, 2003). A presença de NORs múltiplas em populações de *G. brasiliensis* foi descrita pela primeira vez por ALVES- SILVA e DERGAM (2015) e, em seguida por OLIVEIRA et al., (2016), em populações das bacias do rio Doce-MG, do Recôncavo Sul- BA e rio Contas- BA, respectivamente. A presença de um par de cromossomos com NORs é considerada plesiomórfica em relação a condição de NORs múltiplas (HSU et al., 1975). Os cistrons de NORs ocorreram preferencialmente nos cromossomos subtelocêntricos maiores, de acordo com o já descrito nesta espécie (FELDBERG et al., 2003).

As sondas de rDNA 18S marcou a região terminal de apenas um par cromossômico em todas as populações, coincidindo com a posição das NORs, porém cada população marcou um par subtelocêntrico diferente, demonstrando que este caráter é um marcador eficiente para variações interpopulacionais. O espécime que apresentou três cromossomos

marcados pela NOR, apresentou apenas um par de sítios marcados com a sonda 18S, confirmando que a marcação extra evidenciada pela NOR é inespecífica. Essa correspondência direta entre NOR/ 18S foi também observada por VICARI et al., (2006); NETO et al., (2010); PERAZZO et al., (2013); ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e OLIVEIRA et al., (2016). As populações de *G. brasiliensis* das bacias dos rios Doce, Das Contas e do Recôncavo Baiano apresentaram até seis cromossomos marcados com esta sonda (Tabela 1). Comparando os resultados do presente estudo com os de ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e OLIVEIRA et al., (2016) nota-se que o padrão de marcação da NORs, e das sondas rDNA 18S ocorrem, em todas as populações, na região terminal de cromossomos subtelocêntricos, diferindo apenas a quantidade de marcações e no par de cromossomos marcados. Em termos de diferenças quantitativas, ALVES-SILVA e DERGAM (2015) e OLIVEIRA et al., (2016) indicam um número máximo de três pares de cromossomos marcados, enquanto que nas populações analisadas neste estudo, aparecem apenas um par de cromossomos marcados. Este último padrão foi também encontrado em populações de *G. brasiliensis* do Rio Grande do Sul (PERAZZO et al., 2013).

A sonda de rDNA 5S foi detectada na região intersticial do braço longo de um par de cromossomos subtelocêntricos, sendo conservada no par 9 em todas as populações (Tabela 3). Estudos sobre a localização do gene ribossômico 5S em *G. brasiliensis* foram apresentados pela primeira vez por VICARI et al., (2006a), os quais descreveram a localização desse gene na região intersticial do braço longo do décimo par de cromossomos st/a. Desde então, o mesmo resultado de marcação simples na região intersticial tem sido observado em outras populações, nunca em sintonia com o rDNA 18S (Tabela 1) (VICARI et al., 2006; NETO et al., 2010; PERAZZO et al., 2013; ALVES-SILVA e DERGAM, 2015; OLIVEIRA et al., 2016), mostrando que essa característica é conservada nessa espécie. Neste trabalho e no de OLIVEIRA et al., (2016) a marcação da sonda de rDNA 5S foram identificadas no par de cromossomos número 9.

O FISH com sondas de DNA repetitivo tem sido uma ferramenta utilizada em estudos evolutivos de peixes (por exemplo, SANTOS et al., 2009; CIOFFI et al., 2011). Este estudo foi o primeiro a aplicar sonda de hibridização fluorescente CA₍₁₅₎ em *G. brasiliensis*. O padrão físico de marcação de uma sonda de DNA repetitivo ao material cromossômico está relacionado com a sua composição (POKORNÁ et al., 2011). A sonda dinucleotídica CA₍₁₅₎ apresentou um padrão de marcação disperso pelos cromossomos de *G. brasiliensis*, similar ao encontrado no gênero *Hoplias* com sondas mononucleotídicas

A₍₃₀₎ e sondas trinucleotídicas CAT₍₁₀₎ e TAA₍₁₀₎ (CIOFFI et al., 2011) e apresentou também marcações nas regiões terminais da maioria dos cromossomos, padrão já descrito para os gêneros *Leporinus*, *Triportheus*, *Hoplias* e *Astyanax* (CIOFFI et al., 2011; CIOFFI et al., 2012; POLTRONIERI et al., 2014; YANO et al., 2014; CUNHA et al., 2016). Não foram detectados padrões divergentes entre as amostras analisadas.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os cariótipos com o primeiro par cromossômico heteromórfico estão restritos à bacia do rio Doce e que a bacia do Paraíba do Sul apresenta três citótipos alopátricos, diferindo no número de cromossomos submetacêntricos e no número de subtelocêntricos/acrocêntricos. A diversificação nas bacias costeiras estudadas por OLIVEIRA et al., (2016) ocorre por conta dos subtelocêntricos/acrocêntricos. Em populações do bacia do rio Paraná e costeiras do Brasil, foram descritos mais quatro cariótipos, sendo que no rio Tibagi, foi também encontrado um cariótipo com 4 submetacêntricos (Tabela 1).

6.2 Padrões moleculares

A filogenia do gene *COI* das amostras de *Geophagus brasiliensis*, somadas as utilizadas por ALVES-SILVA e DERGAM (2015), indicou a existências de três haplogrupos. O haplogrupo I reuniu as populações das bacias do Doce (Córrego latão, rio Piranga- Candonga, rio Santo Antônio e Lagoa aguapé), Paraíba do Sul (rios Pinho, São Francisco do Glória e Paraíba do Sul Genbank), Itabapoana (rio Preto e rio Itabapoana-PCH Calheiros) e São Francisco. O haplogrupo II reuniu os espécimes do rio Mucuri e da bacia do Rio Doce (Lagoa Cristal, Linguíça e Aguapé). O haplogrupo III possui os espécimes do rio Pinho, São Francisco do Glória e Paraíba do Sul (estas últimas obtidas do Genbank). ALVES-SILVA e DERGAM (2015) afirmam que os espécimes da bacia do rio Mucuri estão intimamente relacionados com os espécimes das lagoas da bacia do rio Doce, este resultado também é visto no presente trabalho com exceção de um espécime da lagoa Aguapé, o qual agrupou no haplogrupo I. O alto grau de parentesco filogenético entre espécies das bacias do rio Doce e rio Mucuri foi observado também em *Hoplias malabaricus* (PEREIRA et al., 2013). Por outro lado, os haplogrupos de *H. malabaricus* (PEREIRA et al., 2013) mostraram um forte isolamento entre Doce e o Paraíba do Sul, enquanto que esse padrão é menos evidente em *G. brasiliensis* no trabalho de ALVES SILVA e DERGAM (2015); a composição do haplogrupo I também indica estreito parentesco de *G. brasiliensis* entre as bacias do Doce e Paraíba do Sul. Os espécimes da

bacia do rio Paraíba do Sul separaram-se em dois haplogrupos diferentes; as sequências do Genbank, com base na análise de máxima verossimilhança (Anexo 2), formaram um haplogrupo mais externo, aparecendo como grupo irmão de todas as outras sequências. Por outro lado, na análise bayesiana, ele é grupo irmão dos espécimes do rio Pinho e Córrego Latão.

Diferentemente dos resultados de ALVES-SILVA e DERGAM (2015), o espécime do rio São Francisco neste trabalho agrupou com os espécimes da localidade rio Itabapoana-PCH Calheiros (bacia do Itabapoana), sugerindo a existência de haplótipos de ampla distribuição no sudeste brasileiro.

Segundo GRANT e BOWEN (1998) valores da diversidade gênica (h) acima de 0,5 são considerados altos, e são interpretados de duas formas distintas de acordo com a diversidade nucleotídica (π): valores de π acima de 0,5% são considerados altos, e combinados com alta divergência gênica, representam populações grandes e estáveis, com longa história evolutiva ou contato secundário entre diferentes linhagens; enquanto valores de π abaixo de 0,5% associados a altos valores de h , são indicativos de um acúmulo de mutações após um evento de gargalo populacional seguido de um rápido crescimento populacional. A combinação de altos valores de h e π abaixo de 0,5% é encontrada nas localidades RSA- rio Santo Antônio e RSF- rio São Francisco sugere que essas populações sofreram evento de retração seguido de expansão populacional.

A alta diversidade haplotípica, juntamente com o elevado número de passos mutacionais que separam o Haplogrupo II dos restantes (Figura 5), sugere um tempo de diversificação da bacia do rio Doce relativamente avançado dentro da espécie, o qual é compatível com a sua configuração única de primeiro par cromossômico heteromórfico.

Os valores encontrados utilizando os testes de Tajima (D) e Fu (Fs) levam a supor um declínio populacional e são indicativos de poucos haplótipos e baixa heterozigose em relação aos sítios segregantes. Nas populações PSGn- Paraíba do Sul GenBank, LA – Lagoa Aguapé e LC – Lagoa Cristal que possuem valores negativos, o teste de Tajima (D), sugere que estas populações estão em expansão populacional recente após um evento de retração.

A análise de variância molecular (AMOVA) nas quatorze localidades mostrou que teve mais variação entre as populações dentro das bacias, do que dentro de cada população, com um valor de F_{ct} não significativo de variabilidade entre as bacias. As estimativas do índice de fixação F_{st} revela a existência de fluxo gênico entre as populações dentro das

bacias e o índice Fct revela uma baixa estruturação genética e um alto fluxo gênico entre as bacias. Sendo assim, os resultados encontrados na filogenia, rede de haplótipos e AMOVA reforçam a ideia que as bacias do sudeste brasileiro possuem haplótipos de ampla distribuição e a hipótese de ligação entre as bacias pode ser explicada pela proximidade das cabeceiras dos afluentes de cada bacia. BIZERRIL (1999), reconhece quatro unidades de afinidades ictiogeográficas entre a bacia do Paraíba do Sul com as demais bacias do Sudeste, identificando a paleo-comunicações derivadas de interconexão fluvial ao nível da plataforma continental ou de erosão remontante de cabeceiras, uma dessas unidades engloba o trecho médio inferior e o baixo do rio Paraíba do Sul, com os sistemas fluviais situados entre o rio Una e as bacias das lagoas de Cima e Feia (ao sul) e entres os rios Itabapoana e Beneventes (ES) (ao norte). Além da possibilidade de capturas de cabeceiras, diferenças fisiológicas e uma maior tolerância dos ciclídeo à água salobra pode explicar a diferença com o padrão apresentado por *H. malabaricus* (PEREIRA et al., 2013), a qual é da divisão primária ou obrigatória de água doce (MYERS, 1938). As populações de *H. malabaricus* apresentam um evidente estruturação ao longo do litoral, tanto no aspecto citogenético quanto o molecular (PEREIRA et al., 2013).

Considerando os dados citogenéticos e moleculares encontrados nesse trabalho, os padrões biogeográficos desta espécie no sudeste brasileiro indicam uma comunicação constante das bacias do leste brasileiro. E as populações encontradas no rio Paraíba do sul estão localmente mais próximas da localidade-tipo da espécie e a população da calha do rio Doce pode ser considerada como uma raça cromossômica dentro deste complexo de populações em processo de especiação.

REFERÊNCIAS

- ABELL, R., THIEME M. L., REVENGA, C., BRYER, M., KOTTELAT, M., BOGUTSKAYA, N., COAD, B., MANDRAK, N., BALDERAS, S. C., BUSSING, W., STIASSNY, M. L. J., SKELTON, P., ALLEN, G. R., UNMACK, P., NASEKA, A., NG, R., SINDORF, N., , ROBERTSON, J., ARMIJO, E., HIGGINS, J. V., HEIBEL, T. J., WIKRAMANAYAKE, E., OLSON, D., LÓPEZ, H. L., REIS R. E., LUNDBERG, J. G., PÉREZ, M. H. S., PETRY, P. (2008). Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, v. 58, n. 5, p. 403–414.
- ALBERT, J. S. e REIS, R. E. (2011). Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. University of California Press, p. 407.
- ALBERTSON, R.C. e KOCHER T.D. (2006). Genetic and development basis of cichlid trophic diversity. *Heredity*, v. 97, p. 211-221.

- ALVES-SILVA, A. P. e DERGAM, J. A. (2015). Cryptic speciation within the neotropical cichlid *Geophagus brasiliensis* (Quoy&Gaimard, 1824) (Teleostei Cichlidae): a new paradigm in karyotypical and molecular evolution. *Zebrafish* v.12, p. 91–101.
- AVISE, J. C, ARNOLD, J. BALL R. M, BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E, REEB, C. A, e SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* v.18:1, p. 489-522.
- AVISE, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA, p. 684.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P. e RÖHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* v. 16, p. 37–48.
- BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. e MOREIRA- FILHO, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* v.1, p.103–120.
- BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA-FILHO O. e GALETTI JR P.M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: Considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, v. 28, p. 153-159.
- BIZERRIL, C. R. S. F. (1999). The ichthyofauna of the Rio Paraíba do Sul watershed. Biodiversity and biogeografic patterns. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 42, p. 233-250.
- BIZERRIL, C. R. S. F. e PRIMO P. B. S. (2001). Peixes de Águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR - SEMADS p. 417
- BRUM, M. J. I e GALETTI Jr P. M. (1998). Teleostei ground plan karyotype. *Journal of Comparative Biology*, v. 2, p. 91–102.
- CIOFFI, M. B, KEJNOVSKÝ E, BERTOLLO, L. A. C. (2011). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome*, v. 132, p. 289–296.
- CIOFFI, M. B, KEJNOVSKÝ E, MARQUIONI V, POLTRONIERI J, MOLINA WF, DINIZ D. et al.,(2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenetic* v.5, p.28.
- CROMBACH, A. e HOGEWEG, P. (2007). Chromosome rearrangements and the evolution of genome structuring and adaptability. *Mol. Biol. Evol.* v.24, p.1130–1139.
- CUNHA, M. S., REIS V. J. C. e DERGAM J. A. (2016). 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.
- EXCOFFIER, L. e LISCHER, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564-567.

- FELDBERG, E. e BERTOLLO, L. A. C. (1985a). Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, v. 38, p. 257-68.
- FELDBERG, E. e BERTOLLO, L. A. C. (1985b). Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical Cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, v. 38, p. 319-24.
- FELDBERG, E., PORTO, J.I.R. e BERTOLLO, L. A. C. (2003). Chromosomal changes and adaptation of Cichlidae fishes during evolution. In: Val A.L. & Kapoor B.G. (eds.). *Fish Adaptation*. New Delhi e New York, Science Publishers, p. 258-308.
- FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* v. 39, p. 783–791.
- FROESE, R. e PAULY, D. (2017). FishBase. World Wide Web electronic publication. Editors. www.fishbase.org, version (06/2017).
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, v. 146, p. 915-925.
- GALETTI, Jr. P. M. (1997). Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology*, v. 65, p. 53-6.
- GALETTI, Jr. P. M., AGUILAR, C. T., MOLINA, W. (2000). Na overview of marine fish cytogenetics. *Hidrobiologia*, v. 420; p. 55-60.
- GRANT, W. S. e BOWEN, B. W. (1998). shallow populations histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, v. 89 (5), p. 415-426.
- HAJIBABAEI, M., SMITH, M. A., JANZEN, D. H., RODRIGUEZ, J. J., WHITFIELD, J. B., et al. (2007). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* v. 6, p. 959–964.
- HATANAKA, T. e GALETTI Jr, P. M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 1829(122), p. 239–244.
- HEBERT, P. D. N. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* v. 270, p. 313–321.
- HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S. e FRANCIS, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* v. 2, p. 1657–1663.
- HOWELL, W. M. e BLACK, D. A. (1980). Controlled silver-staining o nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia* v. 36, p. 1014–1015.
- HSU, T. S., SPIRITO S. E., PARDUE, M. L. (1975). Distribution 18+28s ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* v. 53, p. 25- 36.

KERR, K. C. R., STOECKLE, M. Y., DOVE, C. J., WEIGT, L. A., FRANCIS, C. M., e HEBERT, P. D. N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, v. 7(4), p. 535–543.

KULLANDER S. O. (2003). Family Cichlidae. In: Reis R.E., Kullander S.O. e Ferraris-Jr C.J. (Eds). *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucs, p. 605-655.

LANFEAR, R., CALCOTT, B., HO, S.Y.W., GUINDON, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology Evolution* v. 29, p. 1695–1701.

LEVAN, A., FREDGA, K. e SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* v. 52, p. 201–220.

LIBRADO, P. e ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: A software 671 for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* v. 25, p. 1451–1452.

LOWE-MCCONNELL, R. H. T. (1987). Ecological studies in tropical fish communities. *Ecology* v. 4, n. 2, p. 11–12.

LUCENA, C. A. S., CALEGARI, B. B., PEREIRA, E. H. L. e DALLEGRAVE, E. (2013). O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia* v. 105, p. 20–24.

MARTINS, I. C., PORTELLA-CASTRO, A. L. B. e JULIO JR, H. F. (1995). Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces-Perciformes) from the Parana River. *Cytologia* v. 60, p. 223-31.

MOYLE, P. B., e CECH, J. J. (2000). *Fishes : an introduction to ichthyology* (4th ed). Prentice Hall, Uppersaddle River, NJ.

MICHELE, J. L., TAKAHASHI, C.S. (1977). Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). *Cytologia* v. 42, p. 535–537.

MORITZ, C., PATTON, J. L., SCHNEIDER, C. J., SMITH, T. B. (2000) Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Ecology e systematic*, v. 31, p. 533-563.

MYERS, G. S. (1938). Notes on *Ansorgia*, *Clarisilurus*, *Wallago*, and *Ceratoglanis*, four genera of African and Indo-Malayan catfishes. *Copeia* 1938(2):98. —1948. Note on two generic names of Indo-Malayan silurid fishes, *Wallago* and *Wallagonia*. *Proceedings of the California Zoological Club* v.1(4), p.19–20.

NELSON, J. S., GRANDE, T. C., WILSON, M. V. H. (1984). *Fishes of the World*. 2 Ed. New York: John Wiley e Sons.

NELSON, J. S. (2006). *Fishes of the World*. 3 Ed. United Status of America: John Wiley e Sons.

NETO, F. M., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C., ARTONI, R. F., et al. (2010). Comparative cytogenetic study among three fish species: an

analysis from a water divide region. *Publication Science Biology Saude UFGP* v. 16, p. 19–28.

OLIVEIRA, I. A., ARGOLO, L. A., BITENCOURT, J. A., DINIZ, D., VICARI, M. R., AFONSO, P. R. A. M. (2016). Cryptic chromosomal diversity in the complex "*Geophagus brasiliensis*" (Perciformes, Cichlidae). *Zebrafish*, v. 13, p. 33–44.

PERAZZO, G., NOLETO, R., VICARI, M. R., MACHADO, P., GAVA, A., CESTARI, M. (2011). Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme southern Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 21, p. 509–515.

PERAZZO, G., NOLETO, R., VICARI, M. R., GAVA, A., CESTARI, M. (2013). Trends of karyotypical evolution in the pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, from southern Brazil. *Zoology* v. 116, p.286–292.

PEREIRA, T., SANTOS, U., SCHAEFER, C. E., SOUZA, G. O., PAIVA, S. R., MALABARBA, L. R., SCHMIDT, E. E. e DERGAM, J. A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography* v. 40, p. 905–914.

PIRES, L. B., GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A. L. (2008). Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi River Basin/PR/Brazil. *Caryologia*, v. 61, p. 135-138.

PIRES, L. B, SAMPAIO, T. R, DIAS, A. L. (2015). Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *Crenicichla lepidota*: New report in the family Cichlidae. *Journal of Heredity* v. 106, p. 289–295.

PINKEL, D., STRAUME, T. e GRAY, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 83, p. 2934–2938.

POKORNA, M., KRATOCHVIL, L., KEJNOVSKY, E. (2011). Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet* v.12, p. 90.

POLTRONIERI, J., MARQUIONI, V., BERTOLLO, L. A. C., KEJNOVSKY, E., MOLINA, W. F., LIEHR, T. et al., (2014). Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes. *Cytogenet Genome* v.142, p.40–45.

RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A., HUELSENBECK, J.P., (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic of Biology* v. 61, p. 539–542.

- SANTOS, U., VOLCKER, C. M., BELEI, F. A., CIOFFI, M. B., L. A. C. BERTOLLO, L. A. C., PAIVA S. R. e DERGAM, J. A. (2009). Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, v.75, p. 2326-2343.
- SARMENTO-SOARES, L. M., MARTINS-PINHEIRO, R. F. (2013). A fauna de peixes nas bacias do sul do Espírito Santo , Brasil. *Papavero*, p. 1–37.
- SMITH, W. L., CHAKRABARTY, P., SPARK, J. S. (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae:Cichlinae). *Cladistics* v. 24, p. 625–641.
- SUMNER, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*. North Berwick, United Kingdom p. 294.
- TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* v. 123, p. 585–595.
- TEIXEIRA, T. P., PINTO, B. C. T., TERRA, B. F., ESTILIANO, E. O., GRACIA, D. e ARAÚJO, F. G. (2005). Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Série Zoologia* v. 95(4), p. 347-357.
- TORRES, R. A., MATOSO, D. A. e ARTONI, R. F. (2004). Genética de Peixes Neotropicais. *Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. Biologia e Saúde* v. 10, p. 27–37.
- THOMPSON, K. W. (1979). Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*, 1979: 304-691.
- TURNER, T. F., McPHEE, M.V., CAMPBELL, P., WINEMILLER, K. O. (2004). Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. *Journal of Fish Biology*, v. 64, p. 186-201.
- VICARI, M. R., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO, O. e BERTOLLO, L. A. C. (2006). Basic and Molecular Cytogenetics in Freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic Conservadiorism and Divergence. *Caryologia*, v. 59, p. 260-266.
- VIEIRA, F., ALVES, C. B. M., POMPEU, P. S. (2010). Diagnóstico do conhecimento de vertebrados: peixes. In: DRUMMOND, G.M. et. al. (Org.). *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais subsídio ao Programa Biota Minas*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 181-219.
- VIEIRA, F. e RODRIGUES, R. R. (2009/2010). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. In: DRUMMOND, G.M. et. al. (Org.). *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais subsídio ao Programa Biota Minas*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 05-22.
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. e HEBERT, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* v. 360, p. 1847–1857.

WARD, R. D. e HOLMES, B. H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome *c* oxidase I (*coxI*) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, v.7, p. 899–907.

WARD, R. D (2009). DNA Barcoding: DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* v. 9, p. 1077–1085.

WIMBERGER, P., REIS, R. E. e THOMTON, K. (1998). Mitochondrial phylogenetics, biogeography, and evolution of parental care and mating systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae). *Edipucrs*, p. 509-518.

WHITE, M. J. D (1978) Chain processes in chromosomal speciation. *Systematic Biology* v. 27, p. 285–298.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolos

Processamento dos animais segundo Bertollo et al. (1978), modificado:

1. Injetar no ventre do animal, entre as nadadeiras peitorais e as pélvicas, solução aquosa de colchicina 0,025% na proporção de 1 mL/100 g de peso corporal;
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado durante 30 minutos. Faltando 2 minutos para completar o tempo do colchicina, transferir os peixes para solução de óleo de cravo 4% a fim de anestesiá-los. Eutanasiar o animal e retirar o rim anterior. Bem como retirar fígado, coração e brânquias, fixá-los em 1,5 – 2,0 mL de etanol 100% em tubo eppendorf e armazená-los em freezer -20°C para análises moleculares;
3. Lavar o material em solução hipotônica de KCl 0,075 M, transferindo-o para pequenas cubas de vidro contendo 10 mL de solução hipotônica.
4. Fragmentar o material com auxílio de pinças pequenas de ponta reta. Completar a separação celular por meio de leves movimentos de aspiração e expiração do material com o auxílio de uma seringa hipodérmica até obter uma suspensão celular homogênea;
5. Incubar a solução obtida a 36-37°C durante 20 minutos;
6. Ressuspender o material com cuidado, com ajuda de uma pipeta Pasteur, transferir a suspensão obtida para um tubo falcon e acrescentar 10 gotas de fixador (metanol: ácido acético 3:1) recém preparado;
7. Ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
8. Adicionar vagarosamente 10 mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo;
9. Ressuspender o material com auxílio de pipeta Pasteur;
10. Repetir os passos 7 a 9 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1,5 mL de fixador e ressuspender bem o material e pingar na lâmina ou guardar no freezer em tubos Eppendorf;
11. Para pingar o material, utilizar lâmina bem limpa, mantida em água destilada ou álcool 70% na geladeira. Aquecê-la em água destilada até a temperatura de 60° e pingar o material;
12. Corar com corante Giemsa 5% por 5 minutos.

Análises citogenéticas:

Coloração convencional Giemsa:

1. Pingar de 2 a 3 gotas da suspensão, armazenada em freezer -20°C, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina úmida e recém- aquecida em água destilada a 60°C e deixar secar ao ar;
2. Corar com Giemsa 10% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (9,0 mL de tampão fosfato + 1,0 mL de solução-mãe de Giemsa), durante 10 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar.

Banda NOR - Protocolo modificado de Howell e Black (1980):

1. Preparo da solução reveladora a base de gelatina: dissolver 1g de gelatina branca sem sabor em 50 mL de água destilada morna e adicionar 0,5 ml de ácido fórmico;
2. Preparo da solução de nitrato de prata P.A. (AgNO_3) 50%: pesar 0,5g de nitrato de prata e dissolver em 1mL de água destilada (observação: o eppendorf deve ser protegido da luz com papel alumínio para evitar oxidação da prata);

Procedimento:

1. Descorar as lâminas com fixador 3 metanol: 1 ácido acético, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
2. Adicionar 2 gotas de nitrato de prata, 2 gotas de solução reveladora a base de gelatina e 2 gotas de água destilada, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida em estufa 60°C por 7- 10 minutos, observando a coloração da lâmina até que a mesma adquira cor marrom dourada, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

FISH para sondas específicas 18S e 5S rDNA

PINKEL, D., STRAUME, T. e GRAY, J. W. (1986.) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2934–2938.

PCR para sonda 18S:

	Reação PCR 1x (microlitros)
H ₂ O	13,4
Tampão 10x	2,0
MgCl ₂ 25 mM	1,2
dNTP	0,2
Primer NS1	1,0
Primer NS8	1,0
Taq polimerase	0,2
DNA	1,0
Total	20,0

Programa no termociclador:

	18 S
94° C	3 min
94° C	1 min
55° C	1 min

72° C 2 min

35 times to 2

72° C 5 min

4° C 24 h

PCR para sonda 5S:

	Reação PCR 1x (microlitros)
H ₂ O	13,4
Tampão 10x	2,0
MgCl ₂ 25 mM	1,2
dNTP	0,2
Primer A	1,0
Primer B	1,0
Taq polimerase	0,2
DNA	1,0
Total	20,0

Programa no termociclador:

5 S

94° C	2 min
94° C	1 min
52° C	1 min
72° C	1 min 30 seg.
35 times to 2	
72° C	5 min
4° C	24 h

Recomendações da Roche: Após o PCR, prossegue-se a purificação do mesmo seguido da quantificação do DNA: Recomendação: 1 micrograma de DNA para cada 20 microlitros de reação, logo, são 50 nanogramas de DNA por microlitro de reação. Dilui-se o DNA para o recomendado e, assim, prossegue-se a marcação da sonda com os kits.

Marcação da Sonda:

Método de Nick translation utilizando o kit Dig-Nick Mix e kit Nick-Biotina Mix (Roche). Mix para 8 lâminas:

Tubo 18S: 3,5microlitros do PCR18S + 4microlitros Biotina + 12,5microlitros água

Tubo 5S: 3,5microlitros do PCR5S + 4microlitros Digoxigenina + 12,5microlitros água

Misturar bem. Centrifugar brevemente e incubar por 90 min a 16°C no termociclador (programa Nick 1). Parar a reação com a adição de 1 microlitro de EDTA 0,5M e colocar no termociclador por 10 min a 65°C (programa Nick 2). Armazenar em geladeira até seu uso (ou em freezer -20°C).

1° Dia

1. Preparar as lâminas (podem ser corridas previamente e descoradas)
2. Limpar lamínulas com álcool comercial
3. Adicionar 100 microlitros de RNase na lâmina, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida 37°C por 1 hora

4. Preparar o MIX por lâmina: 2 microlitros 18S + 2 microlitros 5S + 16 microlitros HybMix (pode ser colocado no freezer até a desnaturação no PCR)
5. Retirar as lamínulas e lavar em 2xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
6. Ligar placa aquecedora 72°C
7. Secar as lâminas ao ar
8. Adicionar 50 microlitros de pepsina 0,005%, cobrir com lamínula por 10 min temperatura ambiente
9. 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
10. Formaldeído 10% por 10 min temperatura ambiente (preparar na hora: 100 mL 1xPBS + 1 mL formaldeído)
11. 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
12. Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 min cada
13. Secar ao ar
14. Adicionar 100 microlitros de formamida 70%, cobrir com lamínula e colocar na placa aquecedora 72°C por 2min30seg
15. Desidratar em série alcoólica: 50% GELADO, 70% e 100% por 2 min cada
16. Secar ao ar
17. Desnaturalizar o MIX em termociclador (programa FISHSC: 10 min 85°C e 2 min 4°C)
18. Adicionar 20 microlitros do MIX por lâmina, cobrir com lamínula e deixar overnight em câmara úmida 37°C.

2° Dia

1. 2xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
2. 1xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
3. Incubar 10 min em 3% NFDM 4xSSC (preparar na hora: 80 mL água destilada + 20 mL 20xSSC + 3 gr leite em pó MOLICO)
4. Lavar em 2xSSC rapidamente
5. Aplicar 100 microlitros de solução de detecção em cada lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 1h em câmara úmida 37°C (preparar na hora: 976 microlitros de NFDM + 9 microlitros de FITC-Avidina + 15 microlitros de antidigoxigeninarodamina)
6. 3x 5min em 4xSSCTween temperatura ambiente (Shaker) (Trocar a solução a cada 5 min)

7. Lavar rapidamente em 1xPBS
8. Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 min cada
9. Secar ao ar
10. Adicionar 2 gotas de solução DAPI e cobrir com lamínulas

Conservar na geladeira (e no escuro) até tirar as fotos.

FISH para sondas de DNA repetitivo

As sondas são compradas prontas. Diluição: 1 microlitro da solução de estoque a 100 micromolar para 49 microlitros de água.

1° Dia

1. Preparar as lâminas (podem ser corridas previamente e descoradas)
2. Limpar lamínulas com álcool comercial
3. Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 5 min cada
4. Secar ao ar
5. Secar em estufa 60°C por 1h
6. Preparar o MIX das sondas por lâmina: 2 microlitros da sonda escolhida + 18 microlitros de HybMix. MISTURAR MUITO BEM. Termociclador no programa HybMix: 10 min 75°C e 2 min 4°C.
7. 3 min em jarra de coplin em banho maria 37°C contendo: 1mL HCl 1N + 99mL água destilada + 500 microlitros pepsina + 5 microlitros RNase
8. Jogar fora a solução acima e adicionar 1xPBS por 5min temperatura ambiente
9. Secar ao ar
10. Adicionar 100 microlitros de solução de paraformaldeído 1% em lamínulas e aplicar nas lâminas por 10 min
11. Ligar placa aquecedora 75°C
12. Descartar as lamínulas e 1xPBS por 5 min temperatura ambiente
13. Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 2 min cada
14. Secar ao ar
15. Adicionar 100 microlitros de formamida 70%, cobrir com lamínula e colocar na placa aquecedora 75°C por 3 min
16. Desidratar em série alcoólica: 70% GELADO, 95% e 100% por 2 min cada
17. Secar ao ar

18. Adicionar 20 microlitros do MIX em cada lâmina, colocar a lâmina invertida dentro da câmara úmida 37°C overnight.

2° Dia

1. Ligar banho Maria 65°C
2. 5 min em solução 5mL 20xSSC + 95mL água destilada (solução colocada previamente no banho Maria até atingir 65°C)
3. Descartar a solução salina acima e adicionar 4xSSCTween por 5 min (Shaker)
4. Lavar rapidamente em 1xPBS
5. Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 2 min cada
6. Secar ao ar
7. Adicionar 2 gotas de solução DAPI e cobrir com lamínulas
8. Conservar na geladeira (e no escuro) até tirar as fotos.

Extração de DNA com CTAB segundo Doyle JJ and Doyle JL (1987)

Tampão de homogeneização CTAB: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1.4 M NaCl; 0.2 M EDTA; 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide); 0.2 % 2-mercaptoethanol). Manter a temperatura ambiente se for usar constantemente. Pode por na geladeira, mas pode ficar com aparência leitosa.

Para fazer 200 mL de tampão CTAB:

Acrescentar em 160 mL of ddH₂O:

16.36 g	NaCl
400 µL	β-mercaptoethanol
20 mL	1 M Tris-HCl (pH 8.0)
8 mL	0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)
4 g	CTAB

Misturar na placa de agitação, sem ligar o aquecedor da placa!

Completar para 200 mL

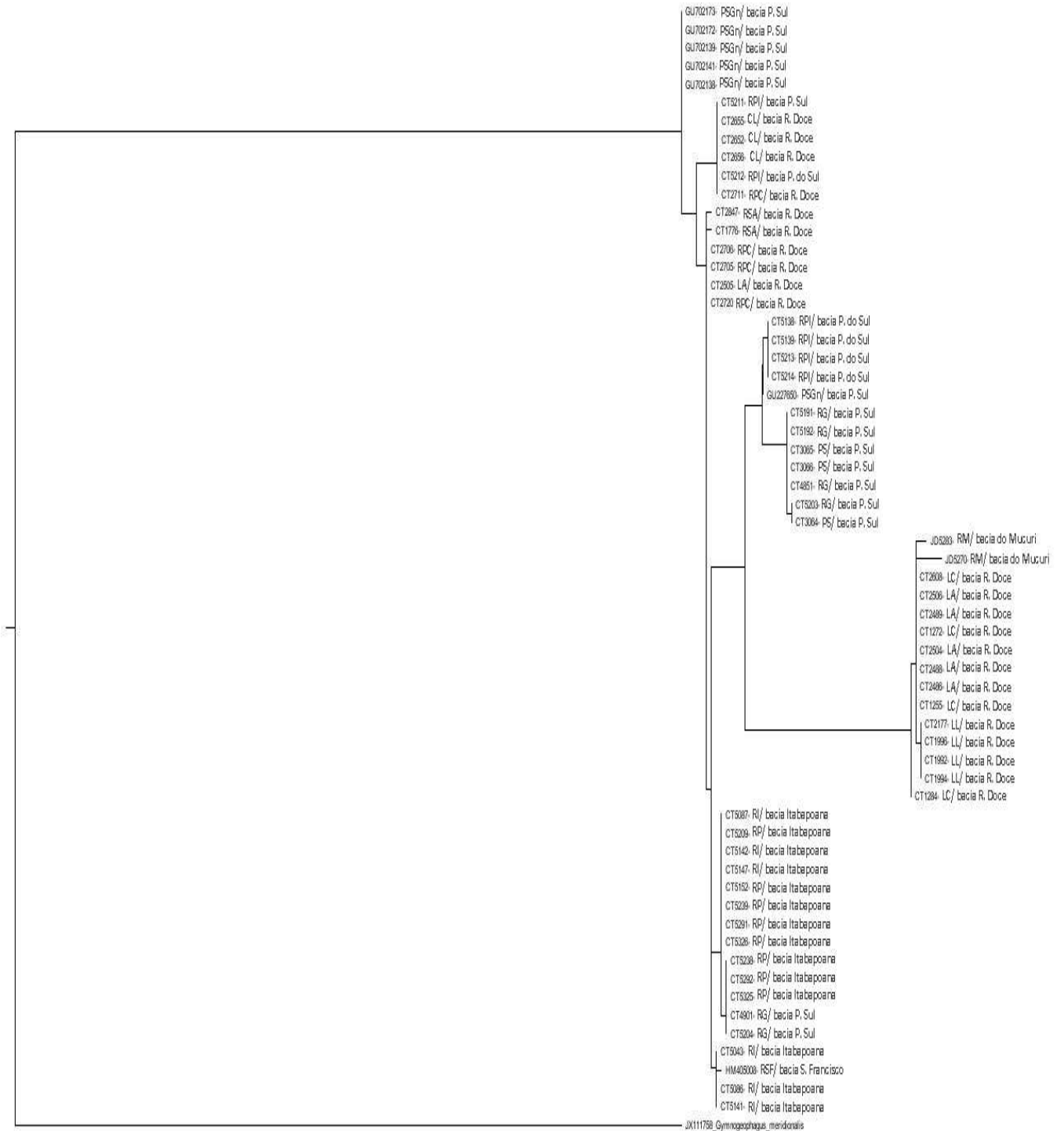
Extração

1. Ligar o Banho Maria a 60-65 °C.

2. Escrever com marcador Sharpie, em três conjuntos de tubos Eppendorf 1.5 mL; numerar na lateral do terceiro conjunto de tubos
3. Cortar um pequeno pedaço, tentando que seja do mesmo tamanho entre os tubos e secar na estufa (37 or 60 °C) se for na estufa de 60 °C por aproximadamente 20 minutos. Não pode ter etanol na amostra, na hora de acrescentar o ctab!! Flambar a tesoura e a pinça para evitar contaminação entre as amostras!
4. Acrescentar 500 µL do tampão de extração CTAB e esmagar o material entre o pistil e a parede do tubo. Se for tecido muscular, o ideal seria deixar o tecido bem esticado. Se for tecido hepático, o tecido esfarela.
5. Incubar em Banho Maria durante um hora, vortexar no começo e a cada 20 minutos para misturar bem o tampão com o tecido.
6. Durante esse tempo, acrescentar 500 µL of clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) ao segundo conjunto de tubos. Cuidado para não apagar as escritas dos tubos!
7. Centrifugue o material do tecido e do CTAB durante 2 min, na velocidade máxima.
8. Remova o sobrenadante (aproximadamente 450 µL) e transfira-o para o Segundo conjunto de tubos.
9. Misturar com cuidado, devagar, para evitar vazamento. Misturar até o líquido adquirir uma aparência leitosa (músculo), ou amarelada clara (fígado).
10. Centrifugue durante 15 min a velocidade máxima.
11. Pipetar a solução aquosa, camada superior (aprox. 400 µL) e transferir para o terceiro conjunto de tubos. Nunca transferir o material semelhante a areia, que fica entre as duas interfases.
12. Acrescentar 250 µL de isopropanol gelado (-20° C) e misturar vagarosamente.
13. Colocar os tubos na geladeira durante pelo menos 30 min. Nesse momento, podem parar o protocolo para almoço ou janta; o protocolo pode continuar no dia seguinte.
14. Centrifugar durante 30 min numa microcentrífuga refrigerada ou não.
15. Retirar com cuidado o sobrenadante, sem perder o pellet (no possível, faça isto à contraluz) O pellet pode soltar ou não da parede do tubo, e, neste momento, pode ser visível ou não. Lavar o pellet em 1 mL de etanol 75% mantido no freezer (-20° C).
16. Centrifugar durante 2 min a velocidade máxima.
17. Retirar com cuidado o sobrenadante, sem perder o pellet (no possível, faça isto à contraluz) O pellet pode soltar ou não da parede do tubo, e, neste momento, pode ser visível ou não. Lavar o pellet em 1 mL de etanol 100% mantido no freezer (-20° C)
18. Centrifugar por 2 min a velocidade máxima.
19. Secar o pellet na estufa de 36 °C
20. Acrescentar pelo menos 50 µL de TE (Tris-EDTA) estéril. Se o pellet for visível, acrescentar 100 µL de TE. Deixar na geladeira de um dia para o outro, para ressuspender o DNA.
21. Guardar na geladeira se for usar imediatamente, ou no freezer para uso no futuro.

Anexo 2:

Árvore de máxima verossimilhança



0.05