

NATÁLIA MARTINS TRAVENZOLI

FILOGENIA CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* (CHARACIDAE: BRYCONINAE) DO LESTE DO BRASIL

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
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

T779f
2013

Travenzoli, Natália Martins, 1987-

Filogenia citogenética e molecular de *Brycon devillei*,
Brycon ferox, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon*
vermelha (Characidae: Bryconinae) do Leste do Brasil / Natália
Martins Travenzoli. – Viçosa, MG, 2013.

ix, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Characidae. 2. Bacias hidrográficas - Brasil.
3. Heterocromatina. 4. Citogenética. 5. Mitocôndria. 6. Peixe.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22 ed. 597.48

NATÁLIA MARTINS TRAVENZOLI

FILOGENIA CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* (CHARACIDAE: BRYCONINAE) DO LESTE DO BRASIL

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: 21 de Agosto de 2013.

Dr. Udson Santos

Dr Gisele Mendes Lessa del Giúdice

Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão pelo amor, paciência, esforço e dedicação, indispensáveis para minha formação pessoal e profissional.
E ao professor Jorge Dergam, pela oportunidade de realizar um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar pessoas especiais em minha vida.

Aos meus pais Antônio Travenzoli e Imaculada agradeço pelo amor, carinho, paciência e pelas orações.

Ao meu irmão pela amizade, amor e compreensão nesses anos.

Aos meus avós, tios, tias e primos da família Martins e Travenzoli pelas orações e torcida durante esses dois anos.

Às meninas da república (a casa das sete mulheres) Tatiana, Gilda, Graziela, Priscilla, Camila e a Mayra pela amizade e ajuda nesses anos de grandes mudanças e aprendizagens. Vocês foram fundamentais nesses anos.

Aos amigos de evolução (Karla, Fabiene, Naysa, Rafael, Wanderson, Rômulo e Nilson) pelas ótimas discussões.

Ao professor Sérgio da Matta, que mesmo sem me conhecer souber perceber minhas dúvidas e mostrar o caminho correto.

Ao professor Lúcio pelas sábias palavras.

Aos membros da banca pela disponibilidade e correção do trabalho.

Ao professor Jorge Dergam. Agradeço pelo acolhimento, orientação, conselhos, incentivo, pelo exemplo de vida e, sobretudo pela oportunidade. Agradeço a confiança no meu trabalho, principalmente por acreditar que conseguiríamos coletar os *Brycon*.

Aos marujos do Beagle pela ajuda em todos os momentos. À Marininha, ao Vinícius e ao Fred pela boa convivência, amizade e pela ajuda nesses dois anos. À Silvana e o Felipe, por sempre estarem dispostos a me ajudar a processar os peixes. À Ana Paula, pela ajuda com as técnicas da citogenética e na análise da bayesiana. À Natália Sanches pela ajuda nas coletas (você pescou um *Brycon*). À Carolina e família, pelo acolhimento e ajuda na coleta dos *Brycon vermelha* e *B. ferox* em Carlos Chagas. À Nicole por sempre me ajudar no laboratório, pelos conselhos e amizade nesse pouco tempo em que nos conhecemos. Ao Hilton por me ajudar a montar o primeiro cariótipo. A ajuda de todos vocês foi fundamental!

À Priscilla, minha amiga de república, de trabalho, de campo. Agradeço pela amizade, além do laboratório. Com a Pri aprendi que os sonhos podem se realizar, basta sonhar. Sua ajuda ao longo desses anos, nas coletas (eu amava quando você e o Udson competiam para pescar, pois assim, as chances de coletarmos um *Brycon* aumentavam, porque eu nunca conseguia pescar rrsrsr), na citogenética, na molecular, nos resumos (principalmente para o congresso de Lavras), nas correções do trabalho foi essencial.

Ao Udson, pela ajuda ao longo de todo o trabalho. No início com as técnicas de citogenética e molecular, depois com os diversos campos e no final com as correções do trabalho. As coletas das bacias do leste do Brasil só foram possíveis pela sua ajuda na pesca, me lembro do seu esforço para entrar no ri Mucuri, com o pescador, às 5 horas da manhã e por disponibilizar a Filó (carro) para as viagens de campo, que chegavam a durar até de 10 horas.

À Nazaré e ao senhor Téia pela ajuda para coletar os peixes no rio Santo Antônio, Ferros, MG.

Ao Projeto Piabanha pela ajuda com os espécimes de *Brycon insignis*.

Ao Dr. Flávio César Thadeo de Lima, pela identificação dos espécimes de *Brycon opalinus*.

À CAPES pela concessão da bolsa de fomento.

À Universidade Federal de Viçosa e a Pós-Graduação em Biologia Animal pela

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVOS GERAIS	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 INTRODUÇÃO	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
5 RESULTADOS	16
6 DISCUSSÃO	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 Exemplos de *Brycon* das bacias costeiras do leste do Brasil. *Brycon devillei* (a), *Brycon ferox* (b), *Brycon insignis* (c), *Brycon opalinus* (d), *Brycon vermelha* (e).3

ARTIGO

Figura 1 Coloração convencional (Giemsa). *Brycon devillei* (a), *Brycon insignis* (b), *Brycon opalinus* (c), *Brycon ferox* (d) e *Brycon vermelha* (e)..... 18

Figura 2 Padrões de Ag-NORs. *Brycon devillei* (a), *Brycon insignis* (b), *Brycon opalinus* (c), *Brycon ferox* (d) e *Brycon vermelha* (e).. 19

Figura 3 Padrões heterocromáticos (banda-C). *Brycon devillei* (a), *Brycon insignis* (b), *Brycon opalinus* (c), *Brycon ferox* (d) e *Brycon vermelha* (e)..... 19

Figura 4 Padrões heterocromáticos com DAPI. *Brycon devillei* (a), *Brycon insignis* (b), *Brycon opalinus* (c), *Brycon ferox* (d) e *Brycon vermelha* (e)..**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5 Cladograma de Bryconinae baseado em dados do gene 16S (mtDNA) com análise bayesiana. 23

Figura 6 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (COI) com análise bayesiana. 24

Figura S1 Metáfases utilizadas para medir o par cromossômico portado da NORs..34

Figura S2 Protocolo para obtenção das regiões de heterocromatina constitutiva obtida a partir da técnica de Banda-C 35

Figura S3 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (16S) com análise de máxima parcimônia. 34

Figura S4 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (COI) com análise de máxima parcimônia 35

LISTA DE TABELAS

Tabela I Espécies coletadas de briconíneos, número de amostras citogenéticas e moleculares utilizadas, coordenadas geográficas e locais de coleta das espécies nas bacias costeiras do leste do Brasil.....	12
Tabela II Sequências do gene 16S de briconíneos obtidas do GenBank.....	15
Tabela III Sequências do gene COI de briconíneos obtidas no GenBank.....	16

RESUMO

TRAVENZOLI, Natália Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **FILOGENIA CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* (CHARACIDAE: BRYCONINAE) DO LESTE DO BRASIL.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: José Cola Zanúncio.

O gênero *Brycon* é o principal representante da subfamília Bryconinae, com espécies ocorrendo nas bacias hidrográficas do oeste e leste dos Andes. No Brasil, os briconíneos estão distribuídos nos principais sistemas hidrográficos, e por serem sensíveis às alterações negativas no ambiente de correntes das ações antrópicas, a maioria das espécies dessa subfamília estão ameaçadas de extinção. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de existência de uma possível unidade filogeográfica dos Bryconinae que ocorrem nas bacias costeiras do leste brasileiro, uma região caracterizada pelo alto grau de endemismo, utilizando dados citogenéticos (coloração convencional, regiões organizadoras de nucléolos – NORs e banda C) e moleculares mitocondriais (citocromo oxidase I e DNA ribossomal 16S). As espécies de *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* apresentaram número diploide $2n=50$, semelhante às outras espécies de Bryconinae. Porém, suas fórmulas cariotípicas foram características de cada espécie: *B. devillei* ($26m+22sm+2st$), *B. ferox* ($28m+18sm+4st$), *B. insignis* ($22m+20sm+8st$), *B. opalinus* ($24m+20sm+6st$) e *B. vermelha* ($24m+20sm+6st$). Todas as espécies presentes nas bacias costeiras do leste do Brasil apresentaram NORs no primeiro par de cromossomos subtelo-cêntricos e o primeiro par de cromossomos do cariótipo apresentou padrão não equilocal de heterocromatina, indicando que todas essas espécies, junto ao gênero monotípico *Henochilus*, formam um grupo reciprocamente monofilético em relação às espécies continentais. O gene 16S permitiu recuperar as relações filogenéticas mais antigas entre as espécies de Bryconinae, e o gene COI foi utilizado na reconstrução da filogenia das espécies do leste brasileiro. O padrão obtido por ambos os genes corroboraram com a hipótese de monofiletismo das espécies de Bryconinae das bacias costeiras do leste do Brasil. Esta condição provavelmente foi propiciada pela longa história de isolamento das bacias costeiras do leste em relação às bacias continentais.

ABSTRACT

TRAVENZOLI, Natália Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2013. **FILOGENIA CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* (CHARACIDAE: BRYCONINAE) DO LESTE DO BRASIL.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-adviser: José Cola Zanúncio.

The genus *Brycon* is the main representative of the subfamily Bryconinae and its species occur in basins to the West and East of the Andes. In Brazil, Bryconinae species are distributed in the main drainages; because they are affected by anthropogenic impacts, most of these species are threatened. This study is a hypothesis test of whether Bryconinae of the eastern Brazilian coast are a phylogeographic unit, using standard cytogenetic techniques (Giemsa, argyrophilic-nucleolar organizer region -Ag-NORs- detection, and C-banding) and mitochondrial molecular markers (cytochrome oxidase subunit I -COI- and mitochondrial ribosomal 16S) on *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha*. All these species were $2n=50$, as all other Bryconinae. However, their karyotypic formulae were species-specific: *B. devillei* (26m+22sm+2st), *B. ferox* (28m+18sm+4st), *B. insignis* (22m+20sm+8st), *B. opalinus* (24m+20sm+6st) e *B. vermelha* (24m+20sm+6st). All species present in coastal basins of eastern Brazil showed NORs on the first pair of subtelocentric chromosomes and the first pair of chromosomes of the karyotype showed non-equilocal heterochromatin, indicating that all these species, with the monotypic genus *Henochilus* form a group reciprocally monophyletic in relation to the continental species. The 16S allowed to recover phylogenetic relationships among the oldest species Bryconinae, and COI gene was used to reconstruct the phylogeny of the species of eastern Brazil. The pattern obtained for both genes corroborate the hypothesis of monophyly of species Bryconinae of coastal basins of eastern Brazil. This condition probably was caused by the long history of isolation of the eastern coastal basins in relation to continental basins.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A subfamília Bryconinae, pertencente à família Characidae, inclui espécies distribuídas nas bacias hidrográficas da América do Sul e Central [1, 2]. Com históricas exclusões e inclusões de gêneros, esta subfamília é considerada taxonomicamente confusa [3]. Em uma tentativa de agrupar os gêneros *Chalceus* e *Brycon*, Eigenmann [4] foi o primeiro a utilizar o termo Bryconinae. Porém, Géry [5] em uma análise prévia, propôs o epíteto Chalceinae para agrupá-los. Em uma reanálise de *Chalceus* e *Brycon* em 1977 este mesmo autor [6] retoma o termo Bryconinae e cria três tribos: Bryconini, Salminini e Triportheini. Em 1990 Uj [7] eleva Bryconinae ao nível de família, incluindo também os gêneros *Catabasis*, *Lignobrycon*, *Salminus*, *Triportheus*, *Chilobrycon*, *Bryconexodon*. Em 2003 Lima [1] reconsidera válida a subfamília Bryconinae, formada por 43 espécies subdivididas em três gêneros: *Brycon* Müller & Troschel, 1844, com 41 espécies; *Chilobrycon* Géry & de Rham, 1981 e *Henochilus* Garman, 1980, como gêneros monotípicos, e considera *Salminus* como *incertae sedis*.

O gênero *Brycon* é o principal representante de Bryconinae, ocorrendo tanto ao oeste dos Andes, em rios do Peru, Colômbia e Equador, quanto ao leste dos Andes, em todos os rios da América do Sul [1]. As principais características das espécies do gênero são: presença de três séries (raramente quatro) de dentes no pré-maxilar, com os dentes da série interna maiores que aqueles da série externa e um par de dentes sinfisianos no dentário, incomum aos demais Characidae [1]. São popularmente conhecidas como piracanjubas, pirapitingas, piraputangas e piabanhas, sendo consideradas bioindicadoras de qualidade de habitat por ocorrerem preferencialmente em rios de águas limpas com alta oxigenação [1, 3, 8].

No Brasil, as espécies de *Brycon* distribuem-se pelas principais bacias hidrográficas: *Brycon amazonicus* na bacia do rio Amazônia; *Brycon nattereri* e *Brycon orbignyanus* na bacia do rio Paraná; *Brycon hilarii*, *Brycon lundii* e *Brycon orthotaenia* na bacia do rio São Francisco; *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* nas bacias costeiras do leste [1,8, 9, 10, 11] (Figura 1).

As bacias costeiras do leste do Brasil são pequenas e médias drenagens, isoladas das bacias hidrográficas continentais pela Serra do Espinhaço e da Mantiqueira [14,15]. Estas bacias hidrográficas possuem uma elevada diversidade de espécies endêmicas, um padrão biogeográfico possivelmente foi determinado pelos processos geomorfológicos

locais e as alterações eustáticas no nível do mar durante o Quaternário [14, 16, 17]. Dentre as cinco espécies de *Brycon* que ocorrem nas bacias costeiras do leste, *B. devillei*, *B. insignis*, *B. opalinus* e *B. vermelha* estão ameaçadas de extinção. A diminuição do tamanho populacional e consequente risco de extinção destas espécies devem-se principalmente às intervenções antrópicas, como introdução de espécies exóticas, captura predatória intensiva, assoreamento e poluição de rios [8, 9, 13].

Brycon devillei (Figura 1a) é uma espécie onívora de médio porte, que se distribui pelas bacias do rio Doce e Jequitinhonha [10, 13]. Nas décadas de 1980-1990 os únicos registros dessa espécie foram no médio Jequitinhonha e nas lagoas Carioca e Dom Helvécio, pertencentes à bacia do rio Doce [13]. *Brycon ferox* (Figura 1b) é uma espécie de médio porte, endêmica do rio Mucuri, que ocorre principalmente nas proximidades da cidade de Carlos Chagas, Minas Gerais [8]. *Brycon insignis* (Figura 2c), uma espécie de grande porte, é registrada somente na bacia do rio Paraíba do Sul [13]. A redução das populações desta espécie deve-se principalmente à crescente industrialização do Vale do Paraíba do Sul, a introdução de espécies exóticas, como o dourado (*Salminus brasiliensis*) e a construção de barragens hidrelétricas [13, 18]. *Brycon opalinus* (Figura 1d) é uma espécie onívora de médio porte, presente no rio Paraibuna (bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul e nos rios Preto do Itambé, rio Piranga e rio Santo Antônio (bacia hidrográfica do rio Doce) [9, 10, 13]. *Brycon vermelha* (Figura 1e) é uma espécie de grande porte, endêmica do rio Mucuri, que se caracteriza principalmente pela coloração vermelho escuro nas nadadeiras dorsal, adiposa, caudal e anal, o quinto osso infraorbital mais longo do que largo e elevada altura corporal variando entre 31,7% a 37,5% referente ao comprimento padrão corporal [8].

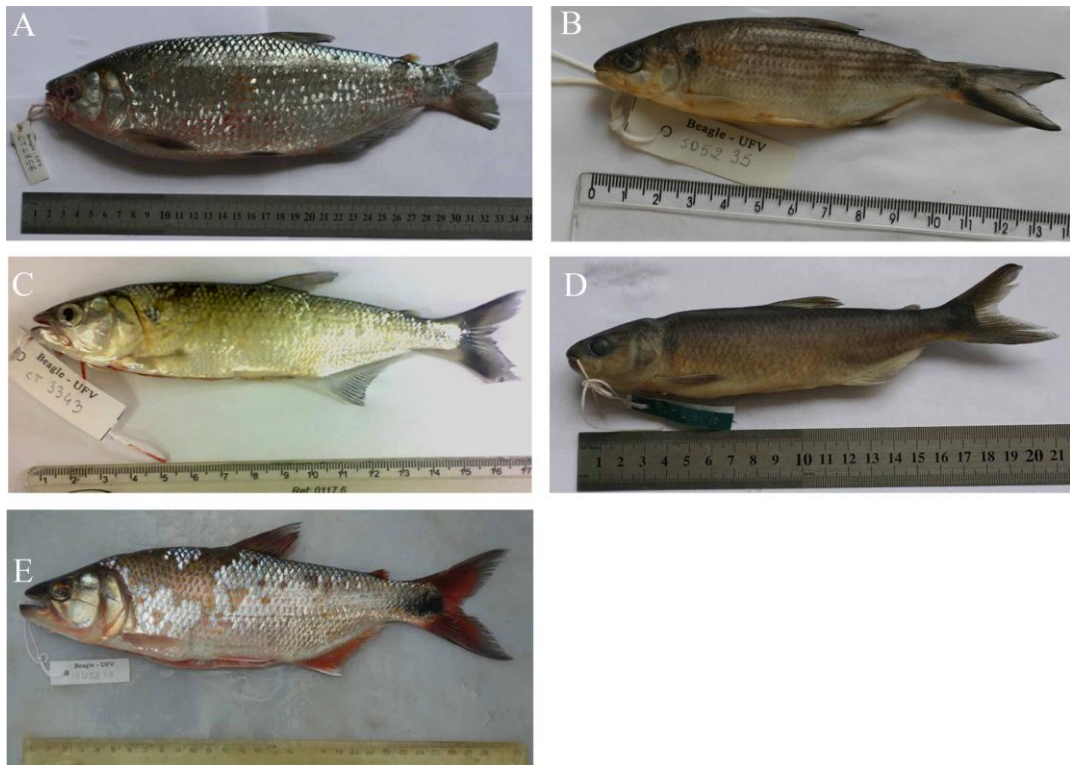


Figura 1 Exemplos de *Brycon* das bacias costeiras do leste do Brasil. *Brycon devillei* (a); *Brycon ferox* (b); *Brycon insignis* (c); *Brycon opalinus* (d); *Brycon vermelha* (e). (Fotos: Jorge Dergam)

Estudos com DNA mitocondrial 16S (mtDNA) demonstraram a condição parafilética de *Brycon*, uma vez que algumas espécies desse gênero estão mais relacionadas a *Henochilus wheatlandii* [19, 20, 21]. Embora poucos, os estudos filogenéticos com as espécies de Bryconinae, distribuídas nas bacias costeiras do leste do Brasil estão restritos à *B. ferox*, *B. opalinus*, *B. insignis* e *H. wheatlandii* [19, 21]. Morfologicamente a diferença entre *Henochilus* e *Brycon* é a presença de duas fileiras de dentes no pré-maxilar em *Henochilus* e três fileiras em *Brycon* [19].

Análises citogenéticas em *Brycon* estão limitadas a espécies que ocorrem nas bacias hidrográficas da Amazônia, São Francisco e Paraná e uma espécie da bacia do rio Paraíba do Sul [21, 22, 23, 24]. Todos esses estudos indicam número diploide de $2n = 50$, para todas as espécies de Bryconinae [25]. As regiões organizadoras de nucléolo (NORs), localizadas terminalmente no braço longo do segundo par de cromossomos submetacêntricos, é considerada uma característica comum a todas as espécies do gênero [22, 23, 24, 25, 26, 27]. Diferente de *Brycon*, o gênero *Henochilus* apresenta marcações de NORs na região telomérica do braço maior do primeiro par cromossômico subtelocêntrico [21].

Baseado em padrões de distribuição de heterocromatina, Margarido & Galetti Jr. [25] propuseram que as espécies de *Brycon* podem ser separadas em dois grupos: o primeiro grupo, que incluem as espécies *B. orthotaenia*, *Brycon falcatus* e *B. insignis*, é caracterizado por marcações heterocromáticas em alguns cromossomos metacêntricos e o segundo grupo, que incluem as espécies de *B. orbignyanus*, *B. hilaarii* e *Brycon cephalus*, é caracterizado pela presença de blocos heterocromáticos pericentroméricos e centroméricos predominantemente em cromossomos submetacêntricos [23]. Por outro lado, Silva e colaboradores [21] identificaram um terceiro padrão em *H. wheatlandii*. Este padrão é definido pela presença de blocos heterocromáticos não-equilocalis e teloméricos no primeiro par cromossômico metacêntrico e blocos heterocromáticos pericentroméricos em cromossomos subtelocêntricos [21].

Com base nesses dados de distribuição heterocromática e a presença, em *H. wheatlandii*, de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) em um par de cromossomos subtelocêntricos, Silva e colaboradores [21] sugeriram que possivelmente as espécies de Bryconinae endêmicas das bacias costeiras do leste brasileiro formam uma unidade filogeográfica. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de existência dessa unidade filogenética para os Bryconinae nesse conjunto de bacias, utilizando dados cariotípicos e moleculares (citocromo oxidase subunidade I – COI- e DNA ribossomal 16S) de *B. devillei*, *B. ferox*, *B. insignis*, *B. opalinus* e *B. vermelha*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima FCT (2003) Subfamily Bryconinae. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porte Alegre: Edipucrs. Pp. 193-233.
2. Lima FCT (2004) *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyol Explor Freshw* 15: 279-287.
3. Howes G (1982) Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull Br Mus Nat Hist (Zool)* 43: 1-47.
4. Eigenmann CH, Myers GS (1929) The American Characidae. *Mem Mus Com Zool* 43: 429-558.
5. Géry J (1964) Poissons characoides nouveaux ou no signalés de l'Ilha do Bananal. *Brésil Vie et Milieu* 17: 448-475.
6. Géry J (1977) Characoids of the world. Neptune City: TFH Publications. 672p.
7. Uj A (1990) Etude comparative de l'osteologie cranienne des poissons de La famille Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
8. Lima FCT, Castro RMC (2000) *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyol Explor Freshw* 11: 55-62.
9. Hilsdorf AWS, Azeredo-Espin AML, Krieger MH, Krieger JE (2002) Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture* 214: 81-91.
10. Vieira F (2006) A ictiofauna do rio Santo Antônio, bacia do rio Doce, MG: proposta de conservação. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.
11. Antunes RSP, Gomes VN, Prioli SMAP, Prioli RA, Julio Jr. HF, Prioli LM, Agostinho CS, Prioli AJ (2010) Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genet Mol Res* 19: 674-684.
12. Rosa RS, Menezes NA (1996) Relação Preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Rev Bras Zool* 13: 647-667.

13. Rosa RS, Lima FCT (2008) In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editor. Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna brasileira. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
14. Buckup PA (2011) The Eastern Brazilian Shield. In: JS Albert & RE Reis Historical, editor. Biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California: EUA.
15. Ribeiro AC, Lima FCT, Riccomini C & Menezes NA (2006) Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: tetimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 17: 157-164.
16. Weitzman SH, Menezes NA & Weitzman MJ (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. In PE Vanzolini, WR Heyer, editor. Academia Brasileira de Ciências.
17. Bizerril CRSF (1994) Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia* 16: 51-80.
18. Matsumoto CK, Hilsdorf AWS (2009) Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotrop Ichthyol* 7: 395-402.
19. Hilsdorf AWS, Oliveira C, Lima FCT, Matsumoto CK (2008) A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. *Genet Mol Biol* 31: 366-371.
20. Oliveira C, Avelino GS, Abbe KT, Mariguela TC, Benine RC, Orti, G, Vari RP, Correa e Castro, RM (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 1: 275.
21. Silva PC, Santos U, Travenzoli NM, Zanuncio JC, Cioffi MB, Dergam JA (2012) The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS ONE* 7: e42278.

22. Almeida-Toledo LF, Bigoni AP, Bernardino G, Foresti F, Toledo-Filho SA (1996) Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia* 49: 35-43
23. Margarido VP, Galetti Jr. PM (1996) Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228
24. Mariguela TC, Nirchio M, Ron E, Gaviria JI, Foresti F, Oliveira C (2010) Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Comp Cytogenet* 4: 185–193.
25. Margarido VP, Galetti Jr PM (1999) Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 22: 357–361.
26. Wasko AP, Galetti Jr PM (2000) Mapping 18s ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genet Mol Biol* 23: 135–138.
27. Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893–902.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Testar a hipótese da existência de uma nova unidade filogeográfica para os Bryconinae no conjunto de bacias costeiras do leste Brasil, utilizando sequências de DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidade I –COI- e DNA ribossomal 16S) e dados citogenéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar o cariótipo, posicionamento de NORs, padrão de banda-C e DAPI das espécies de *Brycon devillei*, *B. opalinus*, *B. ferox* e *B. vermelha* e reanalisar os resultados citogenéticos de *B. insignis*.
- II. Comparar as informações citogenéticas das espécies de *Brycon* das bacias costeiras do leste do Brasil, com os de outras espécies do gênero, para melhor compreender a filogenia dos Bryconinae.

ARTIGO

FILOGENIA CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Brycon devillei*, *Brycon ferox*, *Brycon insignis*, *Brycon opalinus* e *Brycon vermelha* (CHARACIDAE: BRYCONINAE) DO LESTE DO BRASIL

Natália Martins Travenzoli

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia Animal,
Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3 INTRODUÇÃO

A subfamília Bryconinae, pertencente à família Characidae, inclui espécies dos gêneros *Brycon*, *Chilobrycon* e *Henochilus*, distribuídos nas América do Sul e Central [1, 2, 3]. Estudo citogenéticos, moleculares e morfológicos demonstram uma estreita relação filogenética do gênero *Salminus* e os Bryconinae, sugerindo a criação da família Bryconidae (Salmininae e Bryconinae) [4, 5, 6]. O principal representante desta família é o gênero *Brycon* Müller & Troschel 1844, com espécies ocorrendo a oeste dos Andes nos rios da Colômbia, Equador e Peru e a leste nos rios da América do Sul e em bacias hidrográficas que drenam para o mar do Caribe [2]. As principais características das espécies do gênero são: presença de três séries (raramente quatro) de dentes no pré-maxilar, sendo os da série interna maiores que os da série externa e um par de dentes sinfisianos no dentário, incomum aos demais Characidae [2].

Os Bryconinae são peixes migratórios e bioindicadores de qualidade de habitat por ocorrerem preferencialmente em rios de águas limpas com alta oxigenação [1, 2, 6, 7]. No Brasil, estão distribuídos nos principais sistemas hidrográficos e, por serem sensíveis às alterações antrópicas a maioria de suas espécies, incluindo *Brycon devillei* (Castelnau, 1855), *Brycon insignis* Steindachner, 1877; *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) e *Brycon vermelha* Lima & Castro, 2000, estão ameaçadas de extinção [2, 8, 9]. Algumas das espécies de *Brycon* ameaçadas de extinção são endêmicas das bacias costeiras do leste do Brasil. Essas bacias hidrográficas são pequenas e médias drenagens, que se caracterizam por um elevado endemismo de espécies [10,11, 12]. Isoladas das bacias hidrográficas continentais pela Serra do Espinhaço e da Mantiqueira, o padrão biogeográfico da ictiofauna das bacias costeiras foi influenciado pelos processos geomorfológicos locais e as alterações eustáticas no nível do mar [12, 13].

Filogenias moleculares utilizando sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) demonstraram a condição parafilética de *Brycon*, uma vez que algumas de suas espécies estão mais relacionadas a *Henochilus wheatlandii* [14, 15, 16]. Os estudos filogenéticos de Bryconinae, pertencentes às bacias costeiras do leste brasileiro estão restritos às espécies de *Brycon ferox*, *B. opalinus*, *B. insignis* e *H. wheatlandii* [14, 16, 17]. A existência de um grupo monofilético das briconíneos do leste brasileiro foi parcialmente contemplada nos padrões morfológicos propostos por Howes [1] na revisão do gênero

Brycon. Segundo Howes [1] as espécies de *Brycon* são separadas em cinco grupos: o primeiro grupo *Brycon alburnus*, formado pelas espécies de *B. alburnus* e *B. atrocaudatus*; segundo grupo *Brycon falcatus*, formado por *B. falcatus*, *B. opalinus*, *B. cephalus*, *B. amazonicus*, *B. orthotaenia*, *B. moorei*, *B. hilarii* e *B. bicolo*; um terceiro grupo chamado *Brycon guatemalensis* formado por *B. guatemalensis*, *B. striatulus*, *B. meeki*, *B. oligolepis* e *B. rubricauda*; o quarto grupo *Brycon orbignyianus* formado por *B. orbignyianus* e *B. hilarii* e o quinto grupo *Brycon insignis* (*seu acuminatus*), formado por *B. insignis*, *B. ferox*, *B. reinhardti* e *B. devillei*.

Análises citogenéticas em *Brycon* estão limitadas às espécies dos rios Amazonas, Magdalena, Paraíba do Sul, Paraná e São Francisco [18, 19, 20, 21, 22]. Esses estudos indicam um número diploide conservado de $2n = 50$ para as espécies do gênero, sendo o cariótipo caracterizado pela presença de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subteloicêntricos (revisado em Margarido & Galetti Jr. [23]). A localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) na região terminal do braço longo do segundo par de cromossomos submetacêntricos tem sido considerada como característica das espécies de *Brycon* [18, 19, 21, 22, 23, 24]. Baseado em padrões de distribuição de heterocromatina, Margarido & Galetti Jr. [19] propuseram a existência de dois grupos de espécies de *Brycon*: o primeiro seria caracterizado por marcações heterocromáticas pericentroméricas, predominantemente em cromossomos submetacêntricos, enquanto que o segundo grupo apresentaria marcações heterocromáticas nos telômeros de cromossomos metacêntricos. Silva e colaboradores [16] identificaram um terceiro padrão em *Henochilus wheatlandii*, espécie endêmica da bacia do rio Doce. Este padrão é definido pela presença de blocos heterocromáticos não-equilocais e teloméricos no primeiro par cromossômico metacêntrico e blocos heterocromáticos pericentroméricos em cromossomos subteloicêntricos [16].

Com base nesses dados de distribuição de heterocromatina e a presença, em *H. wheatlandii*, de NORs em um par de cromossomos subteloicêntricos, Silva e colaboradores [16] propuseram que as espécies de Bryconinae que ocorrem nas bacias da costa leste do Brasil formam uma unidade filogeográfica. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de existência dessa unidade filogeográfica para Bryconinae nesse conjunto de bacias, utilizando dados cariotípicos e moleculares de DNA mitocondrial

(citocromo oxidase subunidade I –COI- e DNA ribossomal 16S) em *B. devillei*, *B. ferox*, *B. insignis*, *B. opalinus* e *B. vermelha*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM, PREPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS, BANDAMENTO E ANÁLISES CARIOTÍPICAS

Trinta e oito espécimes de *Brycon* foram coletados nas bacias costeiras do leste do Brasil (Tabela I, Mapa I). As coletas foram realizadas com autorização do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO14975-1) a J.A.D. Os espécimes estão depositados na coleção científica do Museu de Zoologia João Moojen em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (MZUFV3564, MZUFV3969, MZUFV4008, MZUFV4012, MZUFV4027, MZUFV4049-4051, MZUFV4092 e MZUFV4144). A nomenclatura das espécies seguiu Lima [2].

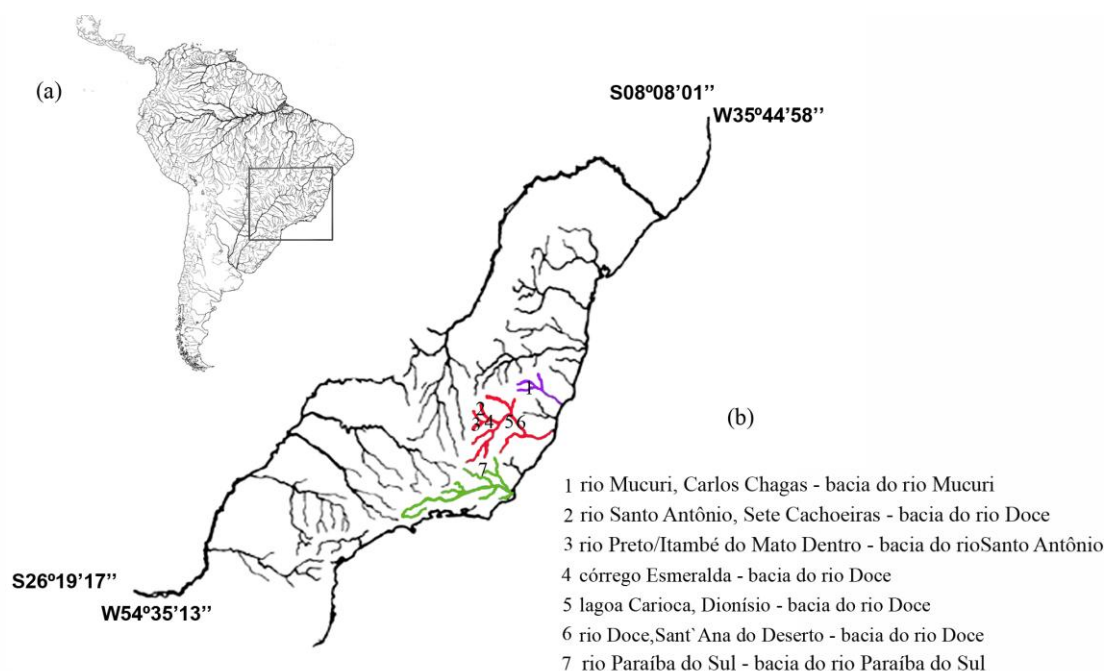
Tabela I Espécies coletadas de briconíneos, número de amostras citogenéticas e moleculares utilizadas, coordenadas geográficas e locais de coleta das espécies nas bacias costeiras do leste do Brasil.

Espécie	Tamanho amostral		Coordenadas GPS	Local (Bacia)
	Citogenética			
	♂	♀		
<i>Brycon devillei</i>	01	00	01	19°45'24"S 42°37'13"O Lagoa Carioca, Dionísio, MG (Doce).
	06	05	03	21°58'07"S 43°07'43"O Rio Doce, Sant'Ana do Deserto, MG (Doce).
	00	02	02	17°41'09"S 40°50'33"O Rio Mucuri, Carlos Chagas, MG (Mucuri).
<i>Brycon ferox</i>	03	02	02	17°41'09"S 40°50'33"O Rio Mucuri, Carlos Chagas, MG, (Mucuri).
<i>Brycon insignis</i>	07	02	02	21°42'35"S 42°07'55"O Rio Paraíba do Sul, Itaocara, RJ (Paraíba do Sul).
<i>Brycon opalinus</i>	01	02	02	19°13'02"S 42°53'03"O Rio Santo Antônio, Sete Cachoeiras, MG (Doce).
	02	00	00	19°13'24"S 42°52'12"O Córrego Esmeralda, Sete Cachoeiras, MG (Doce).

	02	02	02	19°25'11"S43°19'22"O	Afluente do rio Preto/Itambé do Mato Dentro (Doce)
<i>Brycon vermelha</i>	01	02	02	17°41'09"S 40°50'33"O	Rio Mucuri, Carlos Chagas, MG (Mucuri).

Os espécimes coletados foram anestesiados com óleo de cravo [25] e o trabalho foi realizado com autorização 032/2013 do Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de rim cefálico conforme Bertollo e colaboradores [26]. Utilizando a coloração convencional (Giemsa) os cromossomos foram corados e em seguida classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntrico (st) e telocêntricos (t) conforme Levan e colaboradores [27].

As NORs, ativas na última interfase celular foram identificadas por impregnação com nitrato de prata [28] e a razão de braços do par portador da NOR foi medida em 30 metáfases, sendo 11 metáfases em *B. devillei*, quatro em *B. insignis*, três em *B. opalinus*, três em *B. ferox* e três em *B. vermelha*, para confirmar a classificação morfológica (Figura S1). As regiões de heterocromatina constitutiva foram visualizadas a partir da técnica de Banda-C [29] com modificações (Figura S2), substituindo o corante Giemsa por 4', 6' diamidino-2-phenylindole *d*hydrochloride (DAPI) [30]. As imagens das metáfases foram obtidas em microscópio Olympus BX53 e software CellSens Dimensions e medidas em software Image Pro Plus®.



Mapa 1: Mapa da América do Sul (a). Locais de coleta das espécies nas bacias costeiras do leste do Brasil (b).

EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO PCR E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído de tecidos branquiais, musculares ou hepáticos, fixados em etanol 95% segundo Boyce e colaboradores [31]. Os fragmentos dos genes citocromo oxidase subunidade I (COI) e 16S foram amplificados com os iniciadores FishF1t1 e FishR1t1 [32] e Sar-5 e Sbr-3 [33], respectivamente. As reações de PCR para COI foram realizadas em um volume de 12,5 µL [8,76 µL de H₂O; 1,2 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,3 µL de MgCl₂ (100 mM), 0,05 µL dNTPs (20 mM), 0,12 µL de cada *primer* (10 µM), 0,0625 µL (2.5 U) de *Taq* polimerase (*Phonutria*) e 2 µL de DNA (100 ng/µl)] e para 16S em mesmo volume [8,71 µL de H₂O; 1,2 µL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,3 µL de MgCl₂ (100 mM), 0,05 µL dNTPs (20 mM), 0,12 µL de cada *primer* (10 µM), 0,12 µL (5 U) de *Taq* polimerase (*Phonutria*) e 2 µL de DNA (100 ng/µl)] para cada amostra.

Ambos os fragmentos foram amplificados em 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, com desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 30 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto amplificado foi

purificado com precipitação salina (PEG 8000) (20% polyethyleneglycol, 2,5 M NaCl) e o sequenciamento foi realizado na plataforma da Macrogen, Coréia do Sul.

As sequências foram alinhadas utilizando Clustal W [34] implementado no software MEGA 5.0 [35] e os genes analisados separadamente. Os modelos de evolução molecular foram selecionado com base no critério de informação de Akaike AIC, em MrModelTest software 2.3 [36]. A inferência bayesiana (MB) [37] foi realizada para dez milhões de cadeia Markov Monte Carlo (MCMC), sendo uma árvore filogenética amostrada a cada mil gerações. Vinte e cinco por cento das árvores iniciais foram descartadas, sendo as árvores restantes utilizadas para gerar a topologia. As análises de máxima parcimônia foram realizadas em PAUP 4.0b10 [38] e as buscas heurísticas consistiram em 1000 adições aleatórias das sequências utilizando o algoritmo TBR. O sinal filogenético foi estimado usando 1000 pseudorreplicações de bootstrap [39]. Os valores maiores que 0,83 foram considerados como bem sustentados na inferência bayesiana e 83 na análise de máxima parcimônia.

As sequências de DNA amplificadas neste trabalho foram depositadas no GenBank. Sequências de DNA dos genes COI e 16S de espécies de Bryconinae disponíveis no Genbank também foram utilizadas (Tabela I e III).

Tabela II Sequências do gene 16S de briconíneos obtidas do GenBank.

Espécies	Localidade	Número de acesso do Genbank
<i>Brycon amazonicus</i>	Rio Tomo, Colombia	DQ530607
<i>Brycon cephalus</i>	Indisponível	FJ944719
<i>Brycon chagrensis</i>	Rio LIano Sucio, Santa Rita Arriba, Colón, Panamá	DQ530614
<i>Brycon ferox</i>	Rio Mucuri, Espírito Santo, Brasil	DQ530614
<i>Brycon henni</i>	Rio Santacruz, Santander, Colombia	DQ530612
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	AY787976
<i>Brycon insignis</i>	Rio Paraíba do Sul, Caçapava, São Paulo, Brasil	DQ530610
<i>Brycon moorei</i>	Rio Rancheria, Guajira, Colombia	DQ530608
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Paraíbuna, São Luiz de Paraitinga, São Paulo, Brasil	DQ530603
<i>Brycon orbignyanus</i>	Rio Paraná, São Paulo, Brasil	DQ530606
<i>Brycon orthotaenia</i>	São Francisco, Bahia, Brasil	DQ530605
<i>Brycon pesu</i>	Aripuanã, Mato Grosso, Brasil	DQ530604

Tabela II.1 Continuação		
Espécies	Localidade	Número de acesso do Genbank
<i>Brycon petrosus</i>	Rio Llano Sucio, Santa Rita Arriba, Colón, Panamá	DQ530613
<i>Chalceus erythrurus</i>	Indisponível	AY787990
<i>Chalceus macrolepidotus</i>	Indisponível	AY787999

Tabela III Sequências do gene COI de briconíneos obtidas no GenBank.

Espécies	Localidade	Número de acesso do Genbank
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	GU701843
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	GU701844
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	GU701845
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	GU701846
<i>Brycon hilarii</i>	Indisponível	GU701948
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul, RJ, Brasil	GU702082
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul, RJ, Brasil	GU702083
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul, RJ, Brasil	GU702084
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul, RJ, Brasil	GU702085
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul, RJ, Brasil	GU702086
<i>Brycon melanopterus</i>	Indisponível	FJ978040
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itaguaçaba, Paraíba do Sul, SP, Brasil	GU702191
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itaguaçaba, Paraíba do Sul, SP, Brasil	GU702192
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itaguaçaba, Paraíba do Sul, SP, Brasil	GU702193
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itaguaçaba, Paraíba do Sul, SP, Brasil	GU702194
<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itaguaçaba, Paraíba do Sul, SP, Brasil	GU702196
<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio Pandeiros, São Francisco, MG, Brasil	HQ600810
<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio Pandeiros, São Francisco, MG, Brasil	HQ600811
<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio Pandeiros, São Francisco, MG, Brasil	HQ600812
<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio Pandeiros, São Francisco, MG, Brasil	HQ600613
<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio Pandeiros, São Francisco, MG, Brasil	HQ600814
<i>Chalceus macrolepidotus</i>	Indisponível	JF800931
<i>Triportheus nematurus</i>	Bacia do Paraná, SP, Brasil	GU701945

5 RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO CARIÓTIPO

As espécies de *B. devillei*, *B. ferox*, *B. insignis*, *B. opalinus* e *B. vermelha* apresentaram número diploide de $2n= 50$, número fundamental igual a 100 e fórmulas cariotípicas características de cada espécie. *B. devillei* apresentou $26m+22sm+2st$, *B. ferox* $28m+18sm+4st$, *B. insignis* $22m+20sm+8st$, *B. opalinus* $26m+20sm+4st$ e *B. vermelha* $24m+20sm+6st$ (Figura 1). Todas as espécies apresentaram NORs na região telomérica do braço maior do primeiro par de cromossomos subtelocêntricos (Figura 2) e um bloco heterocromático pericentromérico no braço longo do primeiro par metacêntrico. As marcações pericentroméricas foram variáveis entre as espécies, ocorrendo em diferentes pares cromossômicos: em *B. devillei* ocorreram nos pares 14, 15, 17, 18 e 25 (Figura 3a); em *B. ferox* nos pares 15,16 e 24 (Figura 3b); em *B. insignis* nos pares 12,13, 22, 23 e 24 (Figura 3c); em *B. opalinus* nos pares 14, 15, 17 18 e 25 (Figura 3d) finalmente, em *B. vermelha* essas marcações ocorreram nos pares 13, 14, 23 e 24 e foram centroméricas no par 1 (Figura 3e). As marcações de DAPI coincidiram com a banda-C em todas as espécies (Figura 4).

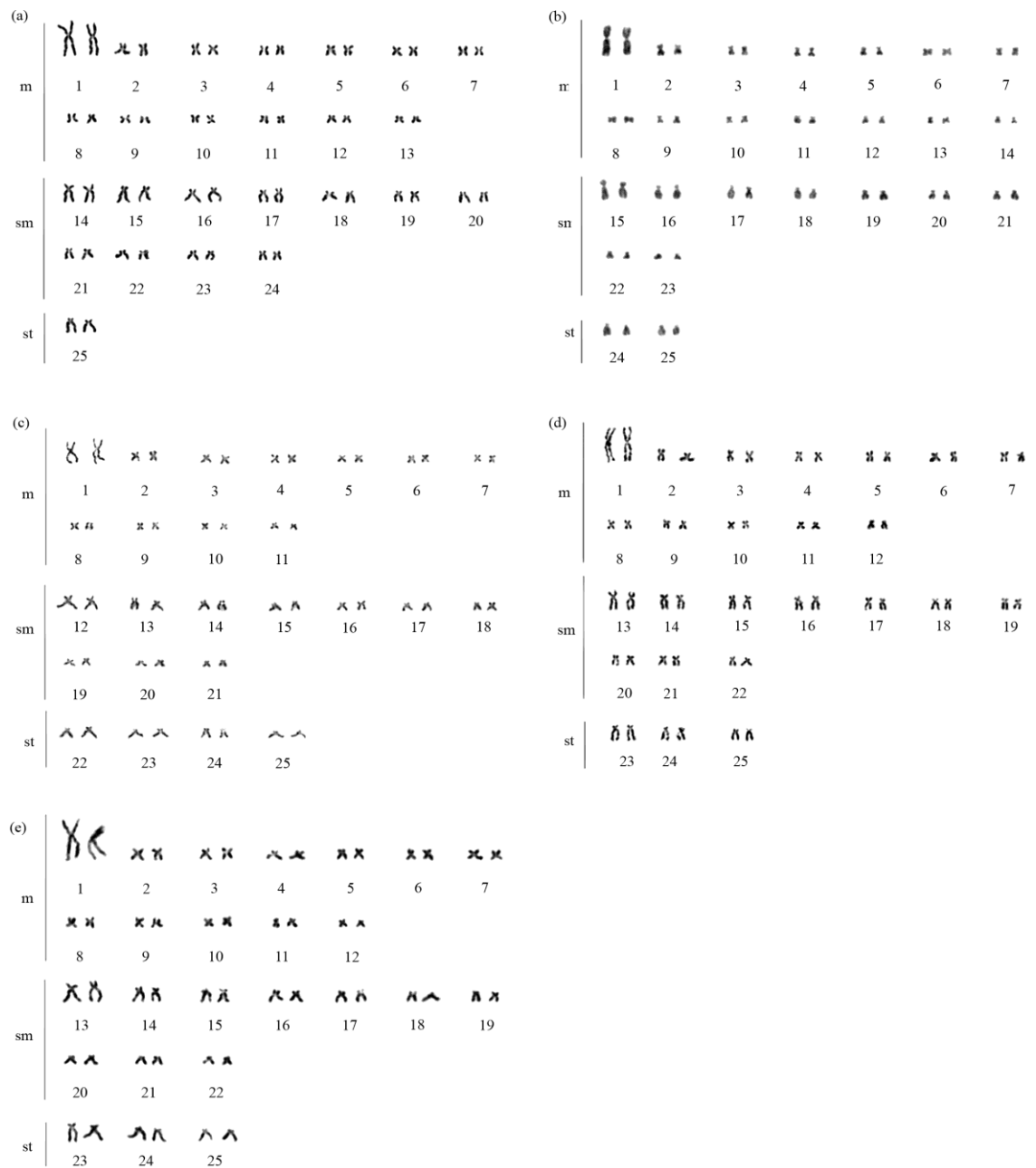


Figura 1 Cariótipo das espécies de *Brycon* das bacias do leste do Brasil. *Brycon devillei* (a), *Brycon ferox* (b), *Brycon insignis* (c), *Brycon opalinus* (d) e *Brycon vermelha* (e). A barra representa 10 μ m.

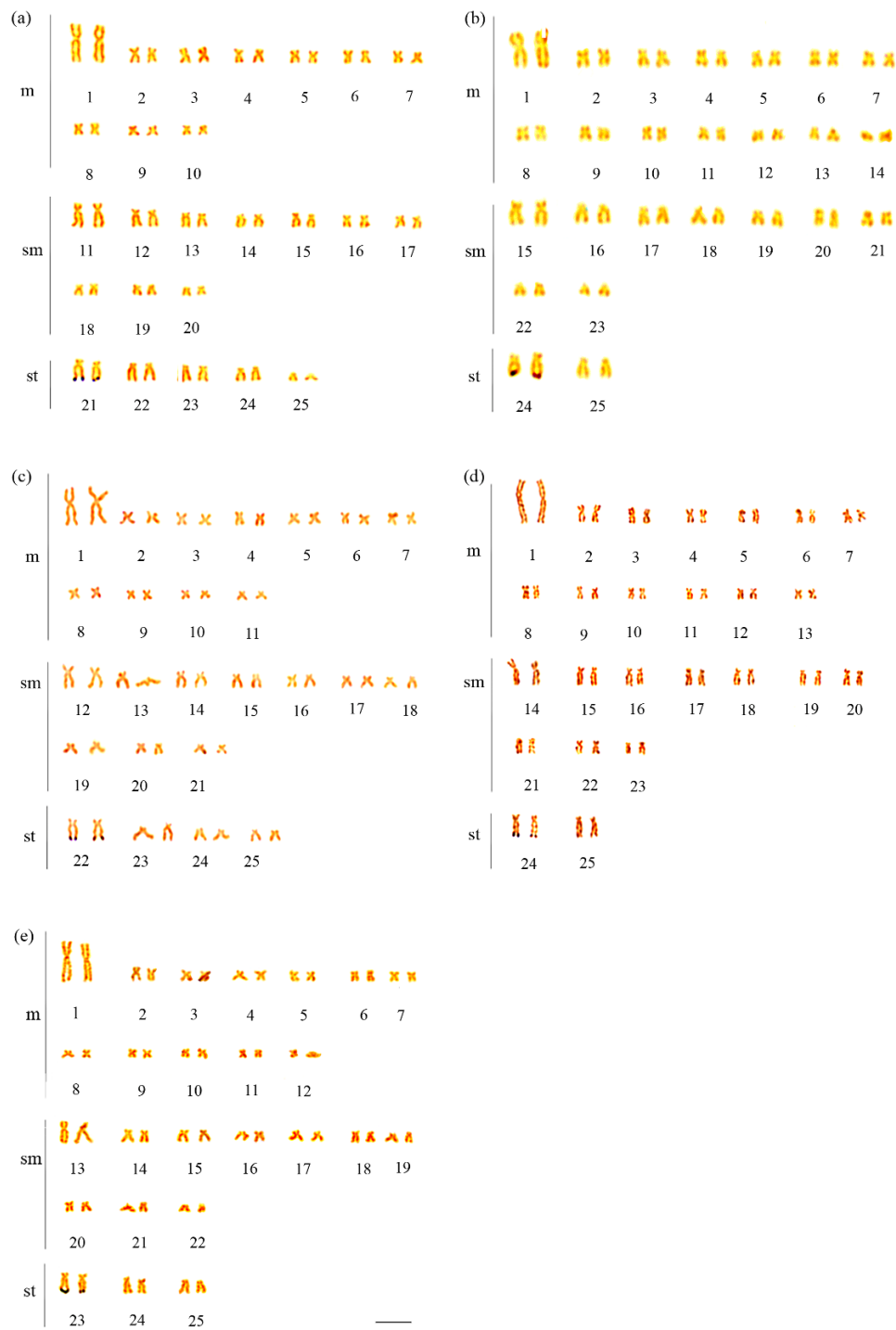
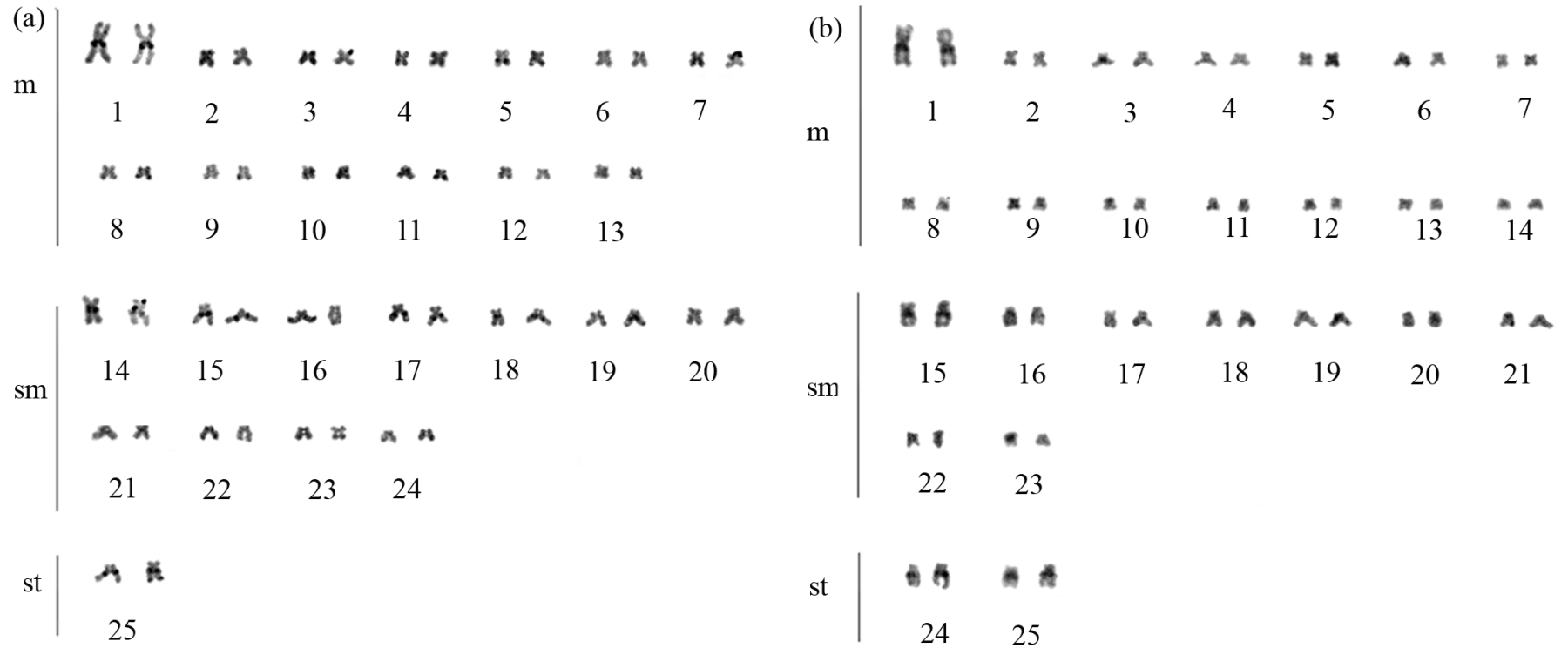


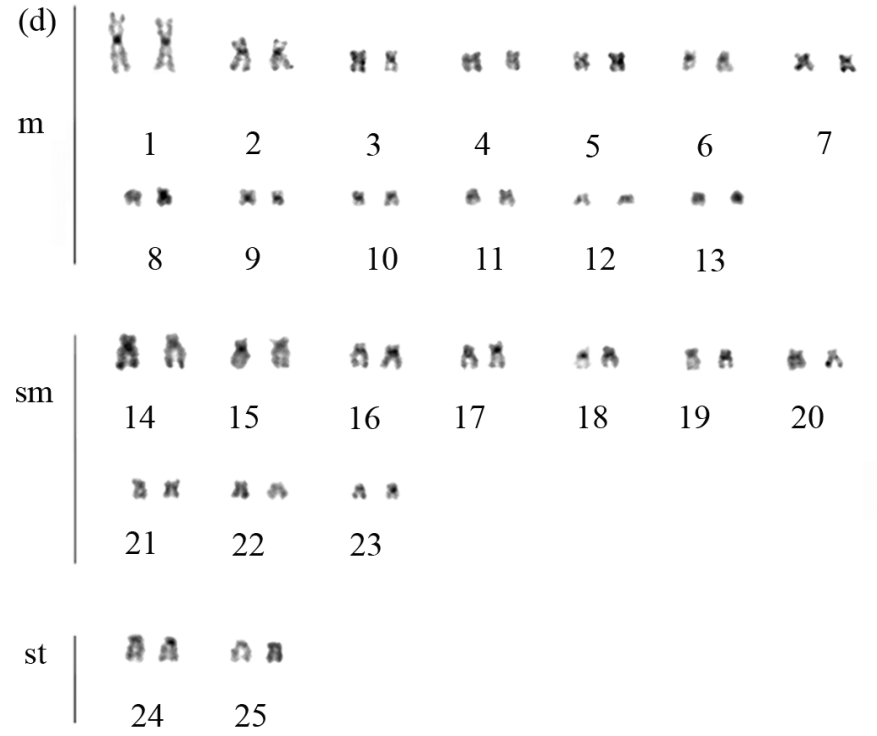
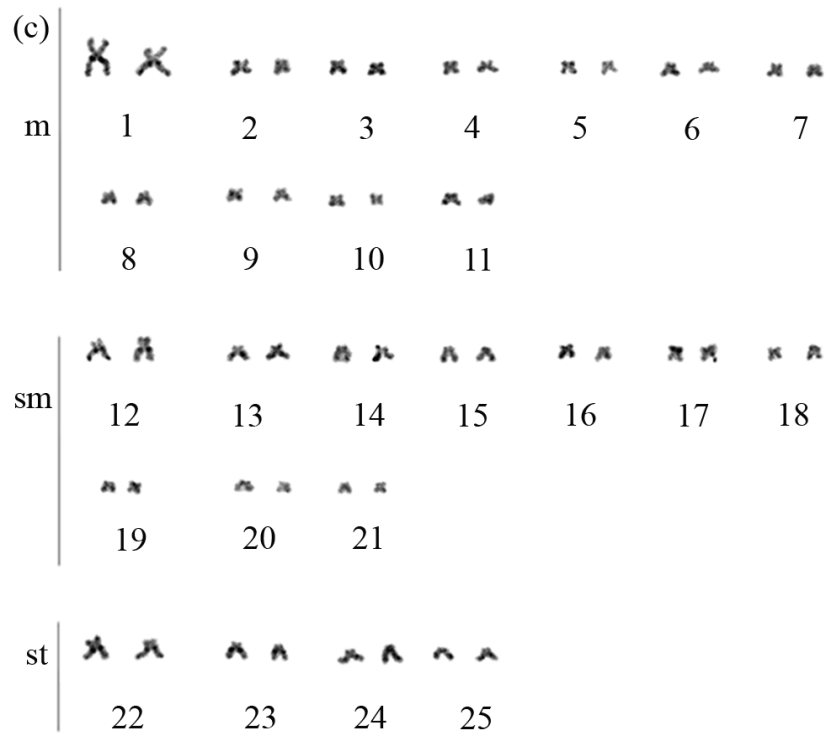
Figura 2 Distribuição das regiões organizadoras de nucléolo ativa na última interfase celular das espécies de *Brycon* das bacias do leste do Brasil. *Brycon devillei* (a), *Brycon*

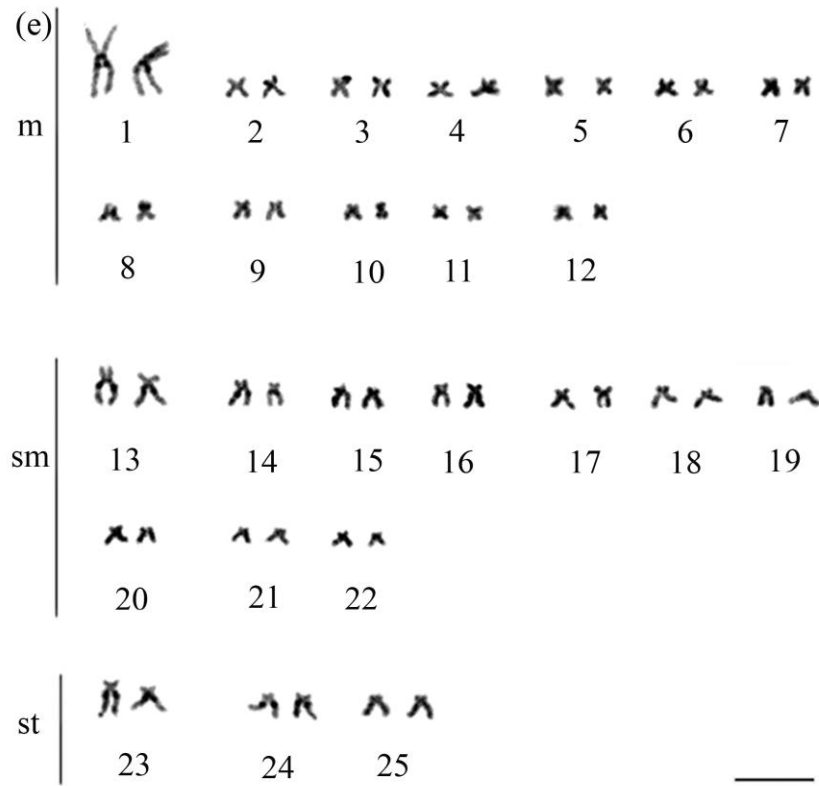
1 *insignis* (b), *Brycon ferox* (c), *Brycon opalinus* (d) e *Brycon vermelha* (e). A barra representa 10 μ m.

2



3





5
6
7
8
9

Figura 3 Padrões heterocromáticos das espécies de *Brycon* das bacias do leste do Brasil. *Brycon devillei* (a), *Brycon insignis* (b), *Brycon opalinus* (c), *Brycon ferox* (d) e *Brycon vermelha* (e). A barra representa 10 µm.

10

11

12 ANÁLISES MOLECULARES

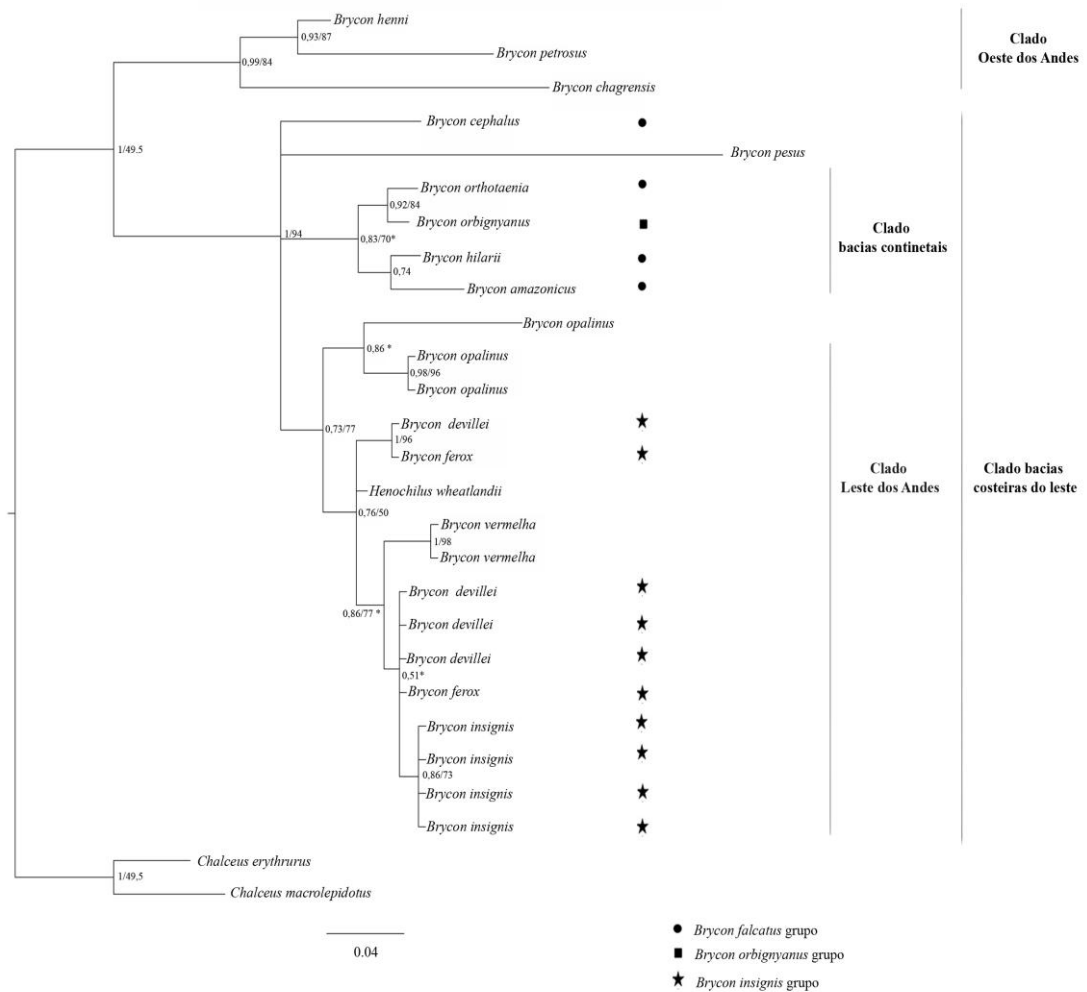
13

14 Foram alinhados 415 pares de bases (pb) do gene 16S e 599 pb do COI; o
15 melhor modelo de evolução molecular para ambos os genes foi HKY+I+G. O gene 16S
16 permitiu recuperar as relações filogenéticas mais antigas entre as espécies de
17 Bryconinae com altos valores de probabilidade posterior e baixos valores bootstrap. O
18 gene COI também apresentou altos valores de probabilidade posterior e baixos valores
19 bootstrap entre os ramos terminais na árvore filogenética e foi utilizado apenas na
20 reconstrução da filogenia das espécies do sudeste brasileiro. Na discussão das análises
21 dos genes 16S e COI, optamos pelo método de inferência bayesiana por apresentar
22 topologia mais resolvida.

23 O padrão obtido com o gene 16S indica a existência de um clado ocidental aos
24 Andes formado pelas espécies *Brycon henni*, *Brycon petrosus* e *Brycon chagrensis*. Por
25 outro lado, o clado oriental aos Andes indica a existência de um sub-haplogrupo
26 representado pelas espécies das bacias continentais, *Brycon orthotaenia*, *Brycon*
27 *orbignyanus*, *Brycon hilarii* e *Brycon amazonicus* e outro sub-haplogrupo que ocorre
28 nas bacias costeiras do leste brasileiro, o qual incluiu *B. opalinus*, *B. devillei*, *B. ferox*,
29 *Henochilus wheatlandii*, *B. vermelha*, *B. insignis* (Figura 5).

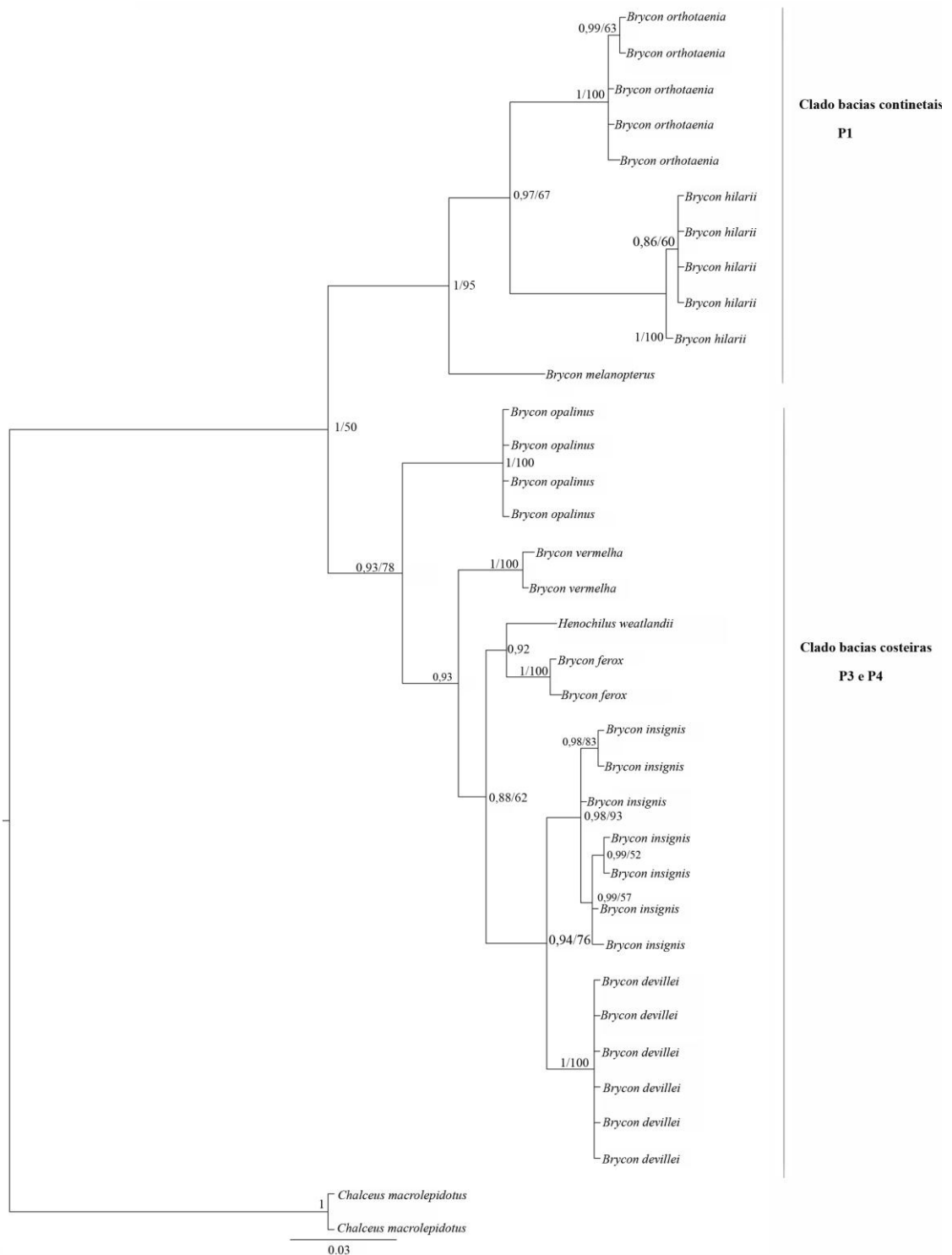
30 Com o gene COI, o clado ao leste dos Andes apresentou três sub-haplogrupos. O
31 primeiro sub-haplogrupo é formado pela espécie de *B. opalinus*, pertencente à bacia do
32 rio Paraíba do sul; o segundo inclui as espécies *B. orthotaenia*, *B. hilarii* e *B.*
33 *melanopterus*, presentes nas bacias continentais e o terceiro sub-haplogrupo
34 representando pelas espécies *B. opalinus*, *H. wheatlandii*, *B. vermelha*, *B. ferox*, *B.*
35 *insignis* e *B. devillei*, distribuídas nas drenagens costeiras do Brasil (Figura 6).

36



37

38 **Figura 5** Hipótese filogenética das espécies de Bryconinae baseado no polimorfismo do
 39 gene 16S (mtDNA) com análise bayesiana e parcimônia. Os números separados por
 40 barras indicam as probabilidades posteriores expressa em **1** e bootstrap expresso em
 41 porcentagem. Os grupos morfológicos propostos por **Howes (1982)** foram indicados da
 42 seguinte forma: círculo, *Brycon falcatus*; quadrado *Brycon orbignyianus*; estrela *Brycon*
 43 *insignis* (*sensu* Lima, 2003). A barra representa a distância molecular.



44
45
46
47
48
49
50
51

Figura 6 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (COI) com análise bayesiana. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e bootstrap (máxima parcimônia), respectivamente. A barra representa a distância molecular. P1, P2 e P3 são os padrões de heterocromatina propostos por Margarido & Galetti Jr. (1996) e Silva *et al.* (2012). As cores dos ramos são correspondentes às bacias hidrográficas de coleta dos espécimes.

52 6 DISCUSSÃO

53

54 O número diploide ($2n=50$) das espécies de *Brycon* distribuídas nas bacias
55 costeiras do leste do Brasil é característico de todos os Bryconinae [16, 18,19, 21, 22,
56 23, 40]. A presença de cromossomos m, sm e st das espécies de *Brycon* das bacias
57 costeiras e de *Henochilus* é semelhante ao observado em espécies do gênero *Salminus*,
58 indicando uma condição cromossômica conservada entre as espécies de *Salminus* e a
59 subfamília Bryconinae [16, 23, 41, 42].

60 A presença de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) na região telomérica
61 do braço maior do primeiro par cromossômico subtelocêntrico de espécies de *Brycon*
62 restritas às bacias costeiras do leste do Brasil é semelhante ao observado por Silva e
63 colaboradores [16] em *Henochilus wheatlandii*. Esse padrão difere do indicado para
64 espécies do gênero *Brycon* distribuídas nas bacias hidrográficas continentais como
65 *Brycon cephalus*, *B. orthotaenia*, *B. hilarii*, *B. orbignyanus*, as quais apresentam um par
66 de NORs no segundo par de cromossomos submetacêntricos [18, 19, 22]. Almeida-
67 Toledo e colaboradores [18] e Margarido & Galetti Jr. [19] indicaram que *B. insignis*
68 apresenta as NORs em um par de cromossomos submetacêntricos. Porém, na amostra
69 de *B. insignis* analisada no presente estudo, a espécie apresenta os sítios de NORs no
70 primeiro par de cromossomos subtelocêntricos. Esta diferença pode indicar a existência
71 de polimorfismo nas populações desta espécie, considerando que ambas as amostras
72 foram coletadas na bacia do rio Paraíba do Sul. Uma possível exceção ao padrão de
73 NORs, localizadas em cromossomos subtelocêntricos, seria a espécie continental
74 *Brycon amazonicus* [20]; porém, a interpretação destes autores difere da figura
75 apresentada, no qual o par portador das NORs é o par 13, segundo par de cromossomos
76 submetacêntricos. Assim sendo, a presença das regiões organizadoras de nucléolos em
77 um par de cromossomos subtelocêntricos em todos os Bryconinae das bacias costeiras
78 do leste brasileiro, corroboram a hipótese de Silva e colaboradores [16] sobre a
79 existência de um grupo monofilético que partilha uma característica cromossômica.

80 Outra característica exclusiva dos briconíneos costeiros do leste é seu padrão de
81 heterocromatina, caracterizado por blocos heterocromáticos pericentroméricos não
82 equilocais no primeiro par de cromossomos metacêntricos, enquanto que as espécies de
83 *Brycon* das bacias continentais apresentam o primeiro par de cromossomos com blocos

84 heterocromáticos equilocais [19, 21, 23]. Considerando a presença de blocos
85 heterocromáticos equilocais em *B. amazonicus*, *B. hilarii*, *B. orthotaenia* e *Salminus*
86 *hilarii*, estas marcações podem indicar uma característica plesiomórfica da subfamília
87 Bryconinae e do gênero *Salminus* [19, 21]. Assim, a perda da equilocalidade deve ser
88 considerada uma sinapomorfia das espécies de briconíneos do leste brasileiro, enquanto
89 que a presença de bloco heterocromático na região telomérica no primeiro par
90 metacêntrico é uma autapomorfia de *Henochilus wheatlandii*.

91 Baseado em padrões de distribuição heterocromática nas espécies de
92 Bryconinae, Margarido & Galetti Jr. [19] sugeriram a existência de dois grupos dentro
93 deste taxon. O primeiro grupo incluiria as espécies *B. cephalus*, *B. hilarii* e *B.*
94 *orbignyanus* “que revelaram bandas teloméricas em **alguns** cromossomos
95 metacêntricos”, enquanto o segundo grupo caracterizar-se-ia por apresentar “bandas C-
96 positivas **predominantemente** centroméricas e pericentroméricas, **especialmente** em
97 cromossomos submetacêntricos”. Este segundo grupo estaria representado por *B.*
98 *orthotaenia*, *Brycon falcatus* e *B. insignis*. Um terceiro padrão de heterocromatina,
99 evidente em *Henochilus wheatlandii*, seria caracterizado por marcações teloméricas no
100 primeiro par metacêntrico e marcações pericentroméricas predominantes em
101 cromossomos subteloecêntricos [16]. Silva e colaboradores [16] propuseram que o
102 terceiro padrão pode ser compartilhado pelos briconíneos das bacias costeiras do leste
103 do Brasil, essa hipótese foi corroborada no sentido de que os briconíneos deste estudo
104 compartilham o padrão de distribuição dos blocos de heterocromatina com *H.*
105 *wheatlandii*. Nosso estudo permitiu uma melhor compreensão do padrão geral de
106 distribuição da heterocromatina em briconíneos e, nesse sentido, a subdivisão de grupos
107 proposta por Margarido & Galetti Jr. [19] é subjetiva, além de propor o padrão equilocal
108 de blocos heterocromáticos que é também padrão indicado em *Salminus*.

109 A existência de um grupo monofilético dos briconíneos do leste brasileiro foi
110 identificada nos padrões morfológicos propostos por Howes [1] na revisão do gênero
111 *Brycon*. Howes [1] reconhece o grupo *Brycon insignis* (seu grupo *Brycon acuminatus*)
112 formado por *B. insignis*, *B. ferox*, *Brycon nattereri* e *B. devillei*. Este grupo é formado
113 principalmente pelas espécies de *Brycon* do leste brasileiro, que compartilham alguns
114 caracteres morfológicos: focinho longo e pontudo, maxila longa com muitos dentes,
115 dentário pequeno e um padrão simples de coloração, caracterizado por mancha umeral e

116 caudal. Com exceção da mancha umeral, *B. vermelha* pode ser colocada neste grupo por
117 possuir todos os outros caracteres [8]. Embora Howes [1] não proponha que espécies do
118 grupo *B. insignis* formem um grupo monofilético, Lima & Castro [8] sugerem que *B.*
119 *vermelha* e o grupo *B. insignis* (demais espécies de *Brycon* da costa leste do Brasil)
120 podem formar uma entidade monofilética, o que confirmado pelos padrões citogenéticos
121 e moleculares analisados neste trabalho.

122 A filogenia obtida com fragmento do gene mitocondrial 16S indica a existência
123 de um clado composto pelas espécies de *Brycon henni*, da bacia do rio Magdalena na
124 Colômbia e *B. chagrensis* e *B. petrosus*, das drenagens do Panamá. Estas espécies
125 devem ter se separado daquelas ao leste dos Andes antes do soerguimento da
126 Cordilheira Oriental que formou o sistema Magdalena [17]. A presença de dois cladogramas
127 bem definidos, um formado por espécies presentes nas bacias continentais e outro
128 formado por espécies coletadas nas bacias costeiras do leste do Brasil conforme os
129 cladogramas dos genes mtDNA 16S e COI pode ser o resultado da história
130 paleohidrológica das bacias costeiras do leste do Brasil, as quais são isoladas pela Serra
131 do Espinhaço e da Mantiqueira, das bacias hidrográficas continentais [13]. Outros
132 trabalhos [43, 44] considerando a história paleohidrológica das bacias costeiras do leste
133 na cladogênese de táxons de peixes, também indicam que os grupos formados nas
134 filogenias correspondem à história paleohidrológica da região. Já no clado das bacias
135 costeiras do leste, as espécies de *Brycon* e *Hemichilus* formaram um grupo
136 monofilético, corroborando os resultados reportados por Castro e colaboradores [41] e
137 Hilsdorf e colaboradores [14]. A falta de sinal filogenético, para separar as espécies de
138 *Brycon* costeiras, provavelmente é decorrente da baixa taxa de substituição nucleotídica
139 do gene 16S. Essa pequena taxa de evolução molecular do gene também pode ser a
140 responsável por se observar a condição não monofilética de *B. ferox* e *B. devillei*. Para
141 explorar de forma mais completa as relações filogeográficas dos *Brycon* costeiras, uma
142 análise filogenética com o gene citocromo oxidase subunidade I (COI) foi utilizada para
143 melhor compreensão das relações filogenéticas e filogeográficas das espécies das bacias
144 costeiras do leste do Brasil.

145 Na filogenia obtida com fragmento do gene COI os espécimes identificados
146 morfologicamente como *Brycon opalinus* do rio do Doce, não formam um grupo
147 monofilético com os *B. opalinus* do rio Paraíba do Sul, os quais aparecem separados em

148 um clado, sugerindo a existência de espécies crípticas dentro desta espécie nominal. No
149 clado das bacias costeiras do leste, a ocorrência de *B. devillei* nas bacias do rio Doce e
150 Mucuri pode ser explicada pela recente história paleohidrológica entre as bacias
151 costeiras do leste presentes entre o rio Paraíba do Sul e a Formação Abrolhos, sujeita à
152 confluência dos rios durante máximos glaciais e ao afogamento dessas drenagens em
153 períodos interglaciais [10, 45], que afetaram de forma evidente a espécie de peixe
154 predador sedentário, *Hoplias malabaricus* [44]. As espécies *B. devillei* e *B. insignis*
155 aparecem como espécies irmãs reciprocamente monofiléticas. O nome *B. devillei* tem
156 sido utilizado para designar a espécie que ocorre na calha e nos lagos do médio rio
157 Doce, entretanto, segundo revisão taxonômica do gênero, a espécie do rio Doce pode ser
158 sinônimo sênior de *Brycon insignis* (Lima, com. pessoal). As análises filogenéticas e as
159 diferenças nas fórmulas cariotípicas e nas marcações dos blocos heterocromáticos entre
160 as duas espécies, sugerem que estas duas populações, não seja a mesma espécie.

161 Os resultados deste estudo confirmam que os Bryconinae das bacias costeiras do
162 leste do Brasil são um grupo monofilético, e que as espécies dessa região apresentam
163 características citogenéticas únicas, tais como o cromossomo subteloentríco portador
164 das NORs e os padrões heterocromáticos característicos de *Hemichilus*, *B. devillei*, *B.*
165 *ferox*, *B. insignis*, *B. opalinus* e *B. vermelha*. Além de apresentar estas características,
166 *H. wheatlandii* apresenta autapomorfias e uma condição de parentesco ainda não
167 resolvida pela COI, fruto de uma história evolutiva independente [16]. Sugerimos que
168 apenas o caráter de ausência ou presença de blocos equilocais de heterocromatina seja
169 utilizado como caráter filogenético não ambíguo, permitindo a separação por estado
170 derivado (ausência de equilocidade) das espécies de briconíneos das bacias do leste
171 brasileiro. Estes resultados demonstram como a citotaxonomia pode ser uma importante
172 ferramenta para entender e resolver problemas relacionados à sistemática [46],
173 permitindo a reavaliação de propostas de subgrupos e fortalecendo a detecção, quando
174 associada a padrões moleculares, de grupos monofiléticos.

175

176 **AGRADECIMENTOS**

177

178 Flávio César Thadeo de Lima pela identificação dos espécimes de *Brycon opalinus*. Ao
179 Projeto Piabanha pela doação dos espécimes de *Brycon insignis*. À Coordenação de

180 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Aos estudantes do
181 Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle).

182

183 **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

184

- 185 1. Howes GJ (1982) Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). Bull Br
186 Mus Nat Hist (Zool) 43: 1-47.
- 187 2. Lima FCT (2003) Subfamily Bryconinae. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP,
188 Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical
189 fishes. Porte Alegre: Edipucrs. Pp. 174-181.
- 190 3. Lima FCT (2004) *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage,
191 Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae), with a key to the species in the
192 basin. Ichthyol Explor Freshw 15: 279-287.
- 193 4. Mirande JM (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiforme):
194 from characters taxonomy. Neotrop ichthyol 8: 385-568.
- 195 5. Cione AL & Azpelicueta MLM (2013) The first fossil species of Salminus, a
196 conspicuous South American freshwater predatory fish (Teleostei, Characiformes),
197 found in the Miocene of Argentina. J vertbr paleontol 33: 1051-1060.
- 198 6. Wasko AP & Galetti Jr. PM (2003) PCR primed with minisatellite core sequences
199 yields species specific patterns and assessment of population variability in fishes of
200 the genus *Brycon*. J Appl Ichthyol 19: 109-113.
- 201 7. Botero-Botero A, Ramírez-Castro H (2011) Ecología trófica de la Sabaleta *Brycon*
202 *henni* (Pisces: Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca. Rev MVZ
203 Cordoba 16: 2349-2355.
- 204 8. Lima FCT, Castro RMC (2000) *Brycon vermelha*, a new species of characid fish
205 from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi:
206 Characiformes). Ichthyol Explor Freshw 11: 55-62.
- 207 9. Rosa RS, Lima FCT (2008) In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editor.
208 Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna brasileira. Belo
209 Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- 210 10. Weitzman SH, Menezes NA & Weitzman MJ (1988) Phylogenetic biogeography of
211 the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the

- 212 distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil.
213 Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. In : PE Vanzolini,
214 WR Heyer, editor. Academia Brasileira de Ciências.
- 215 11. Bizerril CRSF (1994) Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água
216 doce do leste do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia* 16: 51-80.
- 217 12. Buckup PA (2011) The Eastern Brazilian Shield. In: JS Albert & RE Reis
218 Historical, editor. *Biogeography of neotropical freshwater fishes*. University of
219 California Press, Berkeley, EUA.
- 220 13. Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes
221 from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution
222 associated with a divergent continental margin. *Neotrop Ichthyol* 4: 225-246.
- 223 14. Hilsdorf S, Oliveira C, Lima FCT, Matsumoto CK (2008) A phylogenetic analysis
224 of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the
225 mitochondrial gene 16S rRNA. *Genet Mol Biol* 31: 366-371.
- 226 15. Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP,
227 Corrêa e Castro RM (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family
228 Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis
229 and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11: 275.
- 230 16. Silva PC, Santos U, Travenzoli NM, Zanuncio JC, Cioffi MB, Dergam JA (2012)
231 The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living
232 in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS ONE* 7: e42278.
- 233 17. Abe TK (2011) Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília
234 Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de
235 DNA mitocondrial e nuclear. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista,
236 São Paulo.
- 237 18. Almeida-Toledo LF, Bigoni AP, Bernardino G, Foresti F, Toledo-Filho SA (1996)
238 Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in
239 Neotropical Bryconids. *Caryologia* 49: 35-43.
- 240 19. Margarido VP, Galetti Jr. PM (1996) Chromosome studies in fish of the genus
241 *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228.

- 242 20. López DD, Palacio GV, Cortes TR, Angel MO (2008) Caracterización citogenética
243 del pez neotropical *Brycon henni* (Pisces: Characidae). Rev Biol Trop 56: 1619-
244 1628.
- 245 21. Mariguela TC, Nirchio M, Ron E, Gaviria JI, Foresti F, Oliveira C (2010)
246 Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829)
247 (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. Comp Cytogenet 4:
248 185–193.
- 249 22. Wasko AP, Galetti Jr. PM (2000) Mapping 18s ribosomal genes in fish of the genus
250 *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). Genet Mol Biol
251 23: 135-138.
- 252 23. Margarido VP, Galetti Jr. PM (1999) Heterochromatin patterns and karyotype
253 relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces,
254 Characidae). Genet Mol Biol 22: 357–361.
- 255 24. Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr. PM (2001) Molecular organization of
256 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. Genome 44: 893–902.
- 257 25. Henyey E, Kynard B, Zhuang P (2002). Use of eletronarcosis to immobilize juvenile
258 lake and shortnose sturgeons for handling and the effects on their behavior. J Appl
259 Ichthyol 18: 502–504.
- 260 26. Bertollo LAC, Takahashi C, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations
261 on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Braz J Genet 1: 103–120.
- 262 25. Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on
263 chromosomes. Hereditas 1: 201-220.
- 264 26. Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver - staining of nucleolus organizer
265 regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:
266 1014–1015.
- 267 27. Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric
268 heterocromatin. Exp Cell Res 75: 304-306.
- 269 28. Schweizer D (1976) Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin
270 and DAPI. Chromosoma 58: 307-324.
- 271 29. Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark
272 weevils: size, structure and heteroplasmy. Genetics 123: 825–836.

- 273 30. Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer
274 cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* 7: 544–548.
- 275 31. Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis D,
276 Moritz C, Mable B, editor. *Molecular Systematics*. Sunderland: USA.
- 277 32. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994)
278 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence
279 alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight
280 matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- 281 33. Tamura KPD, Peterson NSG, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular
282 Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance,
283 and maximum parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- 284 34. Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. In:
285 Uppsala Sweden, editor. *Evolutionary Biology Centre*. Uppsala University.
- 286 35. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny.
287 *Method Biochem Anal* 17: 754–755.
- 288 36. Swofford DL (2002) PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other
289 methods). Sinauer Associates. Sunderland: MA.
- 290 37. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the
291 bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- 292 38. Parada S, Arias JA, Cruz PE (2003) Caracterizacon cariotipica del yamu (*Brycon*
293 *siebenthalae*). *Rev Orinoquia* 7: 42-46.
- 294 39. Castro RMC, Vari RP, Vieira F, Oliveira C (2004) A phylogenetic analysis and
295 redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). *Copeia* 3: 496–
296 506.
- 297 40. Souza IL, Santos-Silva LK, Venere PC, Moreira-Filho O (2008) Molecular
298 cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes
299 hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* 39: 1036–1041.
- 300 41. Santos U, Volcker CM, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva SR & Dergam
301 JA (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias*
302 *malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *J Fish Biol* 75: 2326–2343.
- 303 42. Pereira TL, Santos U, Schaefer CE, Souza GO, Paiva SR, Malabarba LR, Schmidt
304 EE & Dergam JA (2013) Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch,

305 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. J
306 Biogeogr 40: 905-914.

307 43. Beheregaray LBP, Sunnucks DA & Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation
308 associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside
309 *Odontesthes perugiae* complex. The Royal Society 269: 65–73.

310 44. Stebbins GL (1971) Chromosomal variation in higher plants. Edward Arnold:
311 London.

312

313

314

315

316

317

318

319

320

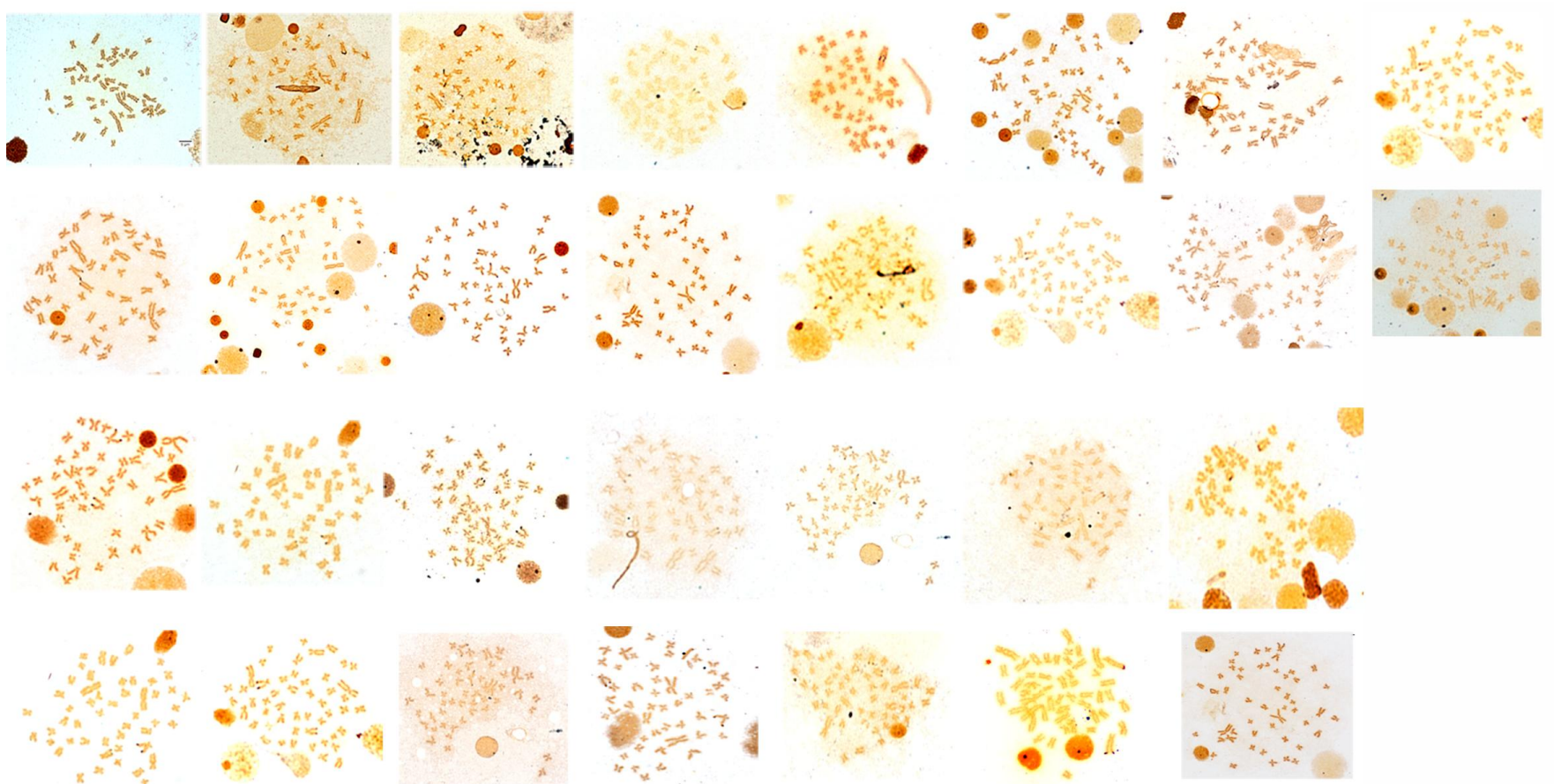


Figura S1 Metáfases utilizadas para medir o par cromossômico portado da NORs. A barra representa 10 μm .

DETECÇÕES DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (BANDA C)

Para o estudo da heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica de Sumner (1972), com pequenas modificações: primeiro o material colocado em HCl 0,2N, na temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida as lâminas foram lavadas em água e secas ao ar. Com as lâminas secas, estas foram incubadas por 55 a 60 segundos, em solução de Ba (OH)₂ 8H₂O, a 5%, a 60°C, recém preparada e filtrada. Lavadas rapidamente em solução de HCl 0,2 N, e logo em seguida lavadas em água destilada. Logo após as lâminas foram incubadas em solução 2X SSC, a 60 °C, por 1 hora e em seguida lavadas var várias vezes em água destilada. Depois de seca, as lâminas foram coradas com Giemsa, diluído 5% por 3 min.

Figura S2 Protocolo para obtenção das regiões de heterocromatina constitutiva obtida a partir da técnica de Banda-C.



Figura S3 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (16S) com análise de máxima parcimônia. Topologia gerada por máxima parcimônia com valores estatísticos expressos em bootstrap. A barra representa a distância molecular.



Figura S4 Hipótese filogenética de Bryconinae, com base em dados de mtDNA (COI) com análise de máxima parcimônia. Topologia gerada por máxima parcimônia com valores estatísticos expressos em bootstrap. A barra representa a distância molecular.