

PRISCILLA CAROLINE SILVA

THE UNIQUE KARYOTYPE OF *HENOCHILUS WHEATLANDII*, A CRITICALLY
ENDANGERED FISH LIVING IN A FAST-DEVELOPING REGION IN MINAS
GERAIS STATE, BRAZIL

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
2012

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

T

S586u
2012

Silva, Priscilla Caroline, 1986-

The unique Karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil / Priscilla Caroline Silva. – Viçosa, MG, 2012.

x, 32f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Henochilus wheatlandii*. 2. Peixe de água doce.
3. Citogenética. 4. Biogeografia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

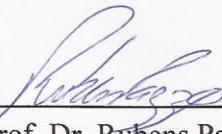
CDD 22. ed. 639.3748

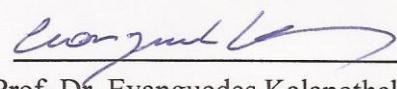
PRISCILLA CAROLINE SILVA

THE UNIQUE KARYOTYPE OF *HENOCHILUS WHEATLANDII*, A CRITICALLY
ENDANGERED FISH LIVING IN A FAST-DEVELOPING REGION IN MINAS
GERAIS STATE, BRAZIL

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: 31 de julho de 2012


Prof. Dr. Rubens Pazza


Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis



Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico aos meus pais Maria Helena (*in memorian*) e Marcélio Silva, exemplos de vida, pelo incentivo aos estudos e por nunca medirem esforços para realização de meus sonhos

“(...) nothing makes sense in biology excepted in the light of evolution...”

Theodosius Dobzhansky 1964

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Helena Silva de Oliveira e Marcélio Silva de Oliveira agradeço o exemplo de honestidade e trabalho, fundamentais na minha formação pessoal e profissional. Agradeço também o incentivo constante aos estudos e o esforço incansável mesmo frente às dificuldades para continuar, por acreditarem ser a formação a melhor herança deixada a mim e aos meus irmãos. E com certeza é!

Aos meus amados irmãos, Marília Gracielle Silva e Marcelo Augusto Silva, razões do meu esforço, pelo incentivo, amizade e pelo entendimento da minha ausência em tantos momentos importantes das vidas deles...

Aos meus avós Hugo e Celípia, carinho e amor constantes, apoio nos momentos difíceis e sem dúvida meus segundos pais. Agradeço os conselhos, a disposição em sempre ajudar, credibilidade e apoio financeiro que me permitiram chegar até aqui.

Às minhas tias Stael, Karla, Grace, Jandra e aos tios Pedro e Cacá pelo incentivo à leitura desde os primeiros anos de vida, saibam que isso foi fundamental no gosto pelos estudos.

À Maria Rita Silvério Pires, minha primeira e querida orientadora por me apresentar a vida acadêmica e me fazer tomar gosto por isso, também agradeço os conselhos, oportunidades e amizade!

Ao grande Jorge! Nossa querido capitão, por abrir as portas do Beagle pra mim em um momento tão difícil. Agradeço por acreditar que eu conseguia e me dar a oportunidade de iniciar em uma nova área. Agradeço a confiança no meu trabalho principalmente por me presentear com tantos estudos extras que me permitiram um enorme crescimento profissional e uma curiosidade sem igual pelos peixes neotropicais que me faz querer

continuar e saber mais e mais. Agradeço também os muitos aprendizados, a amizade e os bons momentos de muitas risadas no Beagle e no campo!

Ao Udson, meu querido companheiro dos momentos, acadêmicos e pessoais. Agradeço por toda sua ajuda, por sua paciência em me ensinar muito do que eu sei de bancada (principalmente biologia molecular) e por nossas intermináveis discussões sobre padrões biogeográficos! Agradeço principalmente a amizade, o amor, a cumplicidade e o companheirismo sempre! Sem você seria mais difícil...

Às meninas! Naty, Gilda, Tati e Grazi, por entenderem as minhas esquisitices e ausência em quase todos os momentos! Valeu a pena e se eterniza aqui nossa amizade...

À Naty Travenzoli, Vinícius, Marininha, Nick, Fred, Ana Paula, Silvana e Carol, queridos marujos do Beagle pela boa convivência e pela ajuda mesmo que pequena que sempre fez toda diferença! Somos uma equipe e juntos chegaremos onde acreditarmos!

À Tininha e ao Seu Cascudo pela ajuda na pescaria aos Andirás e pela logística do laboratório improvisado em Ferros!

À coordenação do programa de pós-graduação em Biologia Animal da UFV, em especial às professoras Gisele Lessa e Mariela Bontempo com quem aprendi muito!

Aos colegas de evolução (Ruston, Hugo, Ju, Luíza e Camila) e ao professor Lúcio Campos pelas discussões intermináveis sobre os temas das aulas que com certeza me proporcionaram muitos conhecimentos.

À CAPES/REUNI pela concessão da bolsa de fomento.

À UFV e pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade de cursar o mestrado.

Agradeço!

Biografia

Priscilla Caroline Silva, filha de Marcélio Silva de Oliveira e Maria Helena Silva de Oliveira (*in memorian*), nasceu dia 27 de junho de 1986, em Itaguara, interior de Minas Gerais.

Residente em Itaguara cursou o ensino de primeira a quarta série na Escola Estadual Padre Gregório. Na Escola Estadual Coronel Frazão, concluiu o ensino fundamental em dezembro de 2000. Cursou as duas primeiras séries do ensino médio na Escola Estadual Alvim Rodrigues do Prado, quando mudou-se para Belo Horizonte para concluir o ensino médio no colégio Soma em dezembro de 2003.

Em agosto de 2005 iniciou o curso de graduação em Ciências biológicas licenciatura na Universidade Federal de Ouro Preto, concluindo-o em agosto de 2009.

Em junho de 2010 ingressou no mestrado pelo Programa de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos em citogenética e filogenia molecular de peixes neotropicais.

Sumário

Lista de figuras.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivos gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Introduction.....	15
4. Materials and methods.....	16
5. Results.....	17
6. Discussion.....	18
7. References.....	22

Lista de Figuras

1 Cariótipo e padrões heterocromáticos de <i>Henochilus wheatlandii</i>	28
2 Padrões de Ag-NORs, CMA ₃ e Hibridização <i>in situ</i> utilizando sondas 18 e 5 S rDNA.....	29
3 Relações filogenéticas dos Bryconinae baseada em dados moleculares e considerações sobre distribuição geográfica dos padrões de heterocromatina e caracteres morfológicos.....	30
S1 Metáfases utilizadas para montagem dos cariótipos apresentados.....	31
S2 Padrões de heterocromatina de <i>Brycon insignis</i> do Paraíba do Sul.....	32

Resumo

SILVA, Priscilla Caroline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **O cariótipo único de *Henochilus wheatlandii* (Characidae:Bryconinae) um peixe criticamente ameaçado numa região de rápido desenvolvimento no Estado de Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko, Karine Frehner Kavalco e José Cola Zanúncio.

Henochilus wheatlandii, única espécie desse gênero, está criticamente ameaçada e por mais de um século foi considerada extinta. A sua redescoberta em 1996 tornou possível o estudo das relações filogenéticas desta espécie dentro da subfamília Bryconinae. O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil citogenético: coloração convencional, bandamento C, NORs, CMA3 e hibridização fluorescente in situ FISH com sondas de rDNA 18S e 5S de rDNA em quatro exemplares de *H. wheatlandii*, coletados no rio Santo Antônio, sub-bacia do rio Doce no município de Ferros, Minas Gerais, Brasil. Os resultados foram comparados com os equivalentes das espécies de Bryconinae. *Henochilus wheatlandii* possui o mesmo número diplóide e morfologia cromossômica das demais espécies de Bryconinae. No entanto, seu padrão de heterocromatina, o padrão de NOR e o FISH mostraram um perfil citogenético único entre os briconíneos neotropicais, enfatizando a unicidade evolutiva desta espécie ameaçada.

Abstract

SILVA, Priscilla Caroline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-advisers: Karla Suemy Clemente Yotoko, Karine Frehner Kavalco e José Cola Zanúncio.

Henochilus wheatlandii, the only species of this genus, is critically endangered and was considered extinct for over a century. The rediscovery of this fish in 1996 made it possible to study its phylogenetic relationships with other species in the subfamily Bryconinae. The aim of this study was to characterise the karyotype of *H. wheatlandii*. Standard staining, C-positive heterochromatin and nucleolar organiser region (NOR) banding, chromomycin A₃ staining, and fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) using 5S rDNA and 18S rDNA probes were conducted on nineteen specimens collected in the Santo Antonio River, a sub-basin of the Doce River in Ferros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Henochilus wheatlandii* shared the same diploid number and chromosome morphology as other species of Bryconinae. However, its heterochromatin distribution patterns, NOR localisation, and FISH patterns revealed a cytogenetic profile unique among Neotropical Bryconinae, emphasizing the evolutionary uniqueness of this threatened species.

1 Introdução Geral

O gênero *Henochilus* e sua única espécie (*Henochilus wheatlandii*) foi descrito por Garman em 1890 [1], com base em um único espécime coletado pela expedição Tayer (1865-18667) na Bacia do rio Mucuri [2]. Após o primeiro registro, um segundo foi realizado pela mesma expedição, porém sem detalhes sobre localidade de coleta [3]. A partir de então esforços em busca de populações de *H. wheatlandii* foram realizados por mais de um século na localidade tipo, mas sem sucesso. Este fato fez com que *Henochilus* fosse considerado em risco de extinção [4] ou mesmo extinto [5]. Em 1996 durante uma expedição ao rio Santo Antônio, sub bacia do rio Doce, localizada ao sul do rio Mucuri, Vieira e colegas [6] redescobriram uma população de *H. wheatlandii*. Desde então a localidade do holótipo tem sido colocada em questão com Vieira e colegas [6] propondo duas hipóteses: a primeira é que as populações do rio Mucuri se extinguiram durante o século 20 e a segunda seria erro na determinação da localidade tipo do holótipo. Castro e colegas [2] realizaram análises morfológicas em espécimes de *H. wheatlandii* do rio Santo Antônio e nos holótipos, supostamente coletados no rio Mucuri. Este autor relata o encontro de características diferentes entre os espécimes de cada bacia, fato atribuído à ontogenia. As populações do rio Santo Antônio apresentam diferenças ontogenéticas em relação à altura do corpo, alimentação, dentição e trato digestório [2].

Desde a descrição, a posição filogenética de *Henochilus* é polêmica, com inúmeras mudanças entre subfamílias. Garman [1] considerou o novo gênero como relacionado à *Tetragonopterus* e *Scissor*, mas sem prover maiores comentários à sugestão. Quarenta anos mais tarde, Eigenmann e Mayers [3] consideraram *Henochilus* como um “membro aberrante” de *Tetragonopterinae*, propondo o agrupamento deste com *Psalidodon gymnodontus* por considerarem a dentição entre os dois gêneros

similares, mas únicas entre os Characidae. Géry [7] baseado principalmente na dentição agrupa estes dois gêneros na tribo Henochilini na subfamília Cheirodontinae e comenta que *Henochilus* possui características que o faz uma forma intermediária entre Cheirodontinae e Tetragonopterinae. Malabarba [8], por sua vez, ao redefinir a subfamília Cheirodontinae exclui *Henochilus* e *Psalidodon* que passam a ser considerados *incertae sedis* em Characidae. Zanata [9] ao realizar uma análise de características morfológicas da subfamília Bryconinae, considera que *Henochilus* possui uma série de caracteres semelhantes à *Chilobrycon*. Finalmente em 2003, Lima [10] considera *Henochilus* como gênero da subfamília Bryconinae. Análises morfológicas e moleculares realizadas por Castro e colegas [2] confirmam a existência de características comuns entre *Henochilus* e os outros Bryconinae. Assim como *Henochilus* a subfamília Bryconinae possui filogenia confusa, com inclusões e exclusões de gêneros, bem como mudanças até mesmo de nível hierárquico ao longo do tempo. O primeiro a utilizar o termo Bryconinae foi Eigenmann [11] em uma tentativa de agrupar *Chalceus* e *Brycon*, mas em 1964 Géry [12] propõe a subfamília Chalceinae para substituir Bryconinae. Ao reanalisar *Chalceus* e *Brycon*, em 1977 Géry [7] retoma o termo Bryconinae e cria três tribos dentro da subfamília: Bryconini, Triportheini e Salminini. Devido à retenção de uma serie de características plesiomórficas, Bryconinae e outros gêneros de Characidae formam um clado mais basal e irmão dos restantes grupos desta família, Uj [13] sugere então a elevação de Bryconinae ao nível de família, a qual incluiria *Brycon*, *Chalceus*, *Catabasis*, *Lignobrycon*, *Salminus*, *Triportheus*, *Chilobrycon* e *Bryconexodon*. Em 2003, Lima [10] incluiu o gênero *Salminus* entre os *incertae sedis* e considera a subfamília Bryconinae composta por apenas os gêneros *Brycon*, *Chilobrycon* e *Henochilus*. Caracteres morfológicos [2, 10, 14] e dados moleculares até 2011 confirmavam a monofilia de Bryconinae [2, 15, 16]. Porém uma

análise molecular, utilizando 2 genes mitocondriais (Citocromo b e 16 S) e 3 genes nucleares (Gene Ativador de Recombinação 1 e 2 e Gene da Cadeia Pesada da Miosina 6), demonstrou o parafiletismo de Bryconinae, uma vez que o gênero *Salminus* agrupou-se dentre as espécies de *Brycon* [17]. Uma série de estudos moleculares já sugeriu uma relação filogenética estreita entre *Salminus* e os Bryconinae [2, 16, 18-20], inclusive Oliveira e colegas [16] sugerem o táxon Bryconidae (Salmininae + Bryconinae) (figura 1). O parafiletismo do gênero *Brycon* é inquestionável, visto a estreita relação de espécies do gênero com *Chilobrycon*, *Henochilus* e *Salminus* [15-17] (figura 2). Howes [14] considera o gênero *Brycon* mal-delimitado devido aos caracteres definidores fluidos e muitas vezes plesiomórficos, presentes em vários membros da família Characidae. A principal diferença morfológica entre *Henochilus* e *Brycon* é o número de fileiras no pré-maxilar [2], característica considerada insuficiente para a não sinonimização de *Henochilus* em *Brycon* [15]. A maioria das espécies de *Brycon* são endêmicas e poucas foram estudadas do ponto de vista citogenético.

A comparação de cariotipos tem sido cada vez mais utilizada na elaboração ou complementação de hipóteses filogenéticas elaboradas a partir de um único gene ou conjunto destes [21]. Substituições nas sequências de nucleotídeos e modificações na evolução cromossômica são dirigidas por processos diferentes; quando dados independentes são usados em conjunto permitem à formulação de hipóteses filogenéticas mais robustas. A evolução cromossônica é representada basicamente por rearranjos cromossômicos que desempenham um papel principal nos eventos de especiação [22]. Os rearranjos podem ser divididos em três classes: os rearranjos robertsonianos são as fusões, fissões e translocações; as inversões pericêntricas e paracêntricas; e a adição ou deleção de heterocromatina, sendo esta última classe considerada neutra e sem efeito direto em processos de especiação [23]. As duas

primeiras classes de rearranjos (translocações, fissões, fussiones e inversões) são consideradas dominantes por possuírem efeitos na especiação já que ocasionam a supressão da recombinação durante a meiose [24, 25], impedindo desta forma o fluxo gênico entre grandes regiões genômicas [26]. A supressão de recombinação é tipicamente associada à inversões [27, 28] e pode explicar as especiações simpátricas e parapátricas, difíceis de explicar pelos clássicos modelos de evolução cromossômica que sugerem adaptações nos cariótipos principalmente por isolamento geográfico [29]. As premissas do modelo de supressão de recombinação foram testadas matematicamente através de comparações entre as sequências de DNA genômico de humanos e chimpanzés em diferentes regiões cromossômicas e o resultado encontrado foi de que genes com taxas mais altas de evolução se encontram em cromossomos rearranjados [30]. Este resultado foi interpretado como uma evidência de que as inversões facilitam a adaptação evolutiva na presença de fluxo gênico [30]. Genes com maiores taxas de evolução dentro ou próximos de regiões onde ocorreram inversões também são registrados em *Drosophila*, *Anopheles* e *Ragholetis* [31]. A redução de recombinação associada à inversões pode facilitar a especiação [32, 33, 34], inclusive simpátrica, pela diminuição do fluxo gênico [29]. As inversões, ao alocarem alelos em *loci* diferentes, influenciam o aumento de isolamento reprodutivo e seu efeito pode aumentar por acumulação [34]. Os rearranjos não robertsonianos, especialmente as inversões, podem ser as principais modificações cromossômicas que determinam os eventos de radiação adaptativa (King 1985 *op cit* Sites e Moritz 1987) [35]. Visto a importância dos rearranjos cromossômicos no isolamento reprodutivo, o estudo de características citogenéticas (número cromossômico, bandeamentos, fórmulas cariotípicas) são filogeneticamente informativas. As marcas citogenéticas encontradas em diferentes espécies e até gêneros, quando comparadas e associadas às hipóteses

filogenéticas de sequências de DNA ou conjuntos de caracteres morfológicos podem revelar padrões biogeográficos e levar a elaboração de hipóteses evolutivas que colaboram para um maior entendimento da história evolutiva dos organismos. Estudos citogenéticos realizados em espécies de *Salminus* revelaram muitas semelhanças com espécies de *Brycon* [36, 37] o que sugeria uma relação estreita entre esses gêneros e veio a ser confirmado por marcadores moleculares [17] e que sem dúvida indica a robustez de dados citogenéticos na elaboração de hipóteses filogenéticas. Considerando a posição incerta do gênero *Henochilus* na subfamília Bryconinae, estudos citogenéticos comparativos podem auxiliar no entendimento dos processos evolutivos envolvidos na diferenciação das espécies e gêneros contidos nessa subfamília. Sendo assim o objetivo deste estudo é caracterizar citogeneticamente a população de *Henochilus weathlandii* do rio Santo Antônio e comparar esses dados com os de outras espécies de *Brycon* disponíveis em literatura, a fim de compreender melhor as relações filogenéticas desta espécie dentro da subfamília.

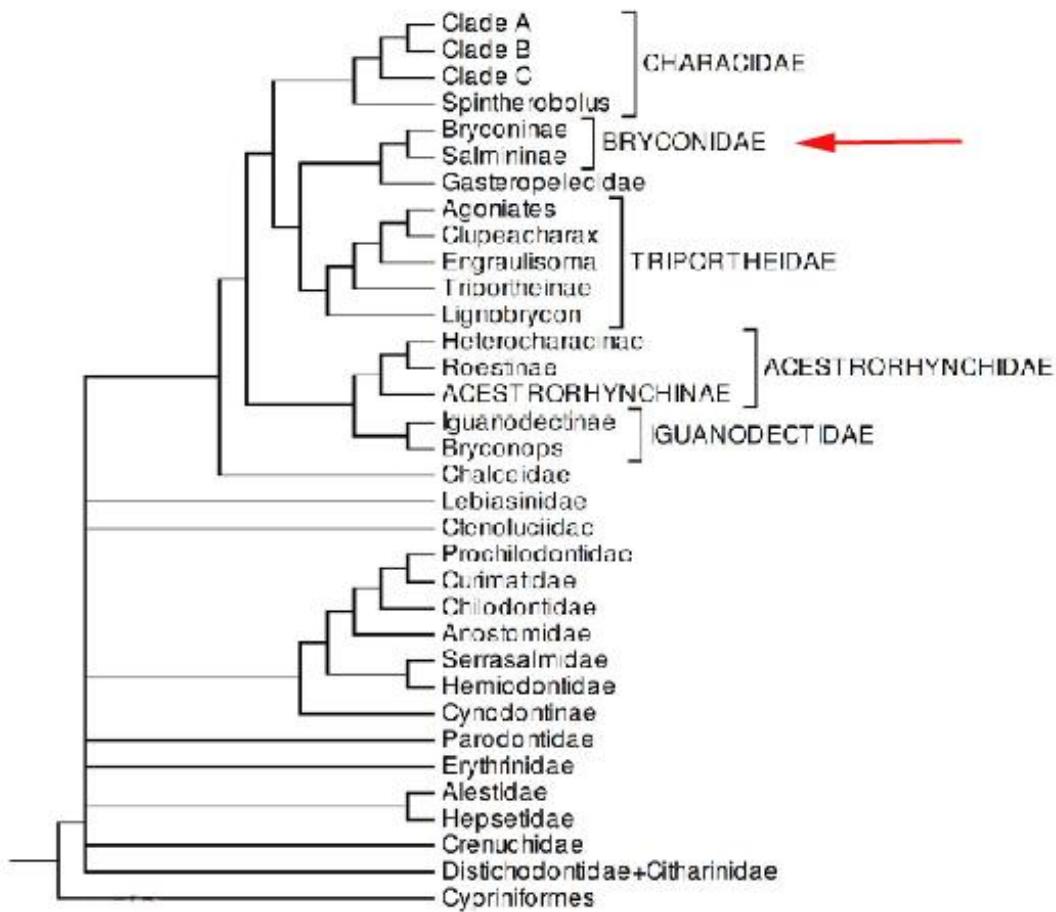


Figura 1: Modificação de Oliveira et al 2011. A seta em vermelho indica o clado Bryconidae proposto por estes autores devido à estreita relação do gênero *Salminus* com as demais espécies de Bryconinae.

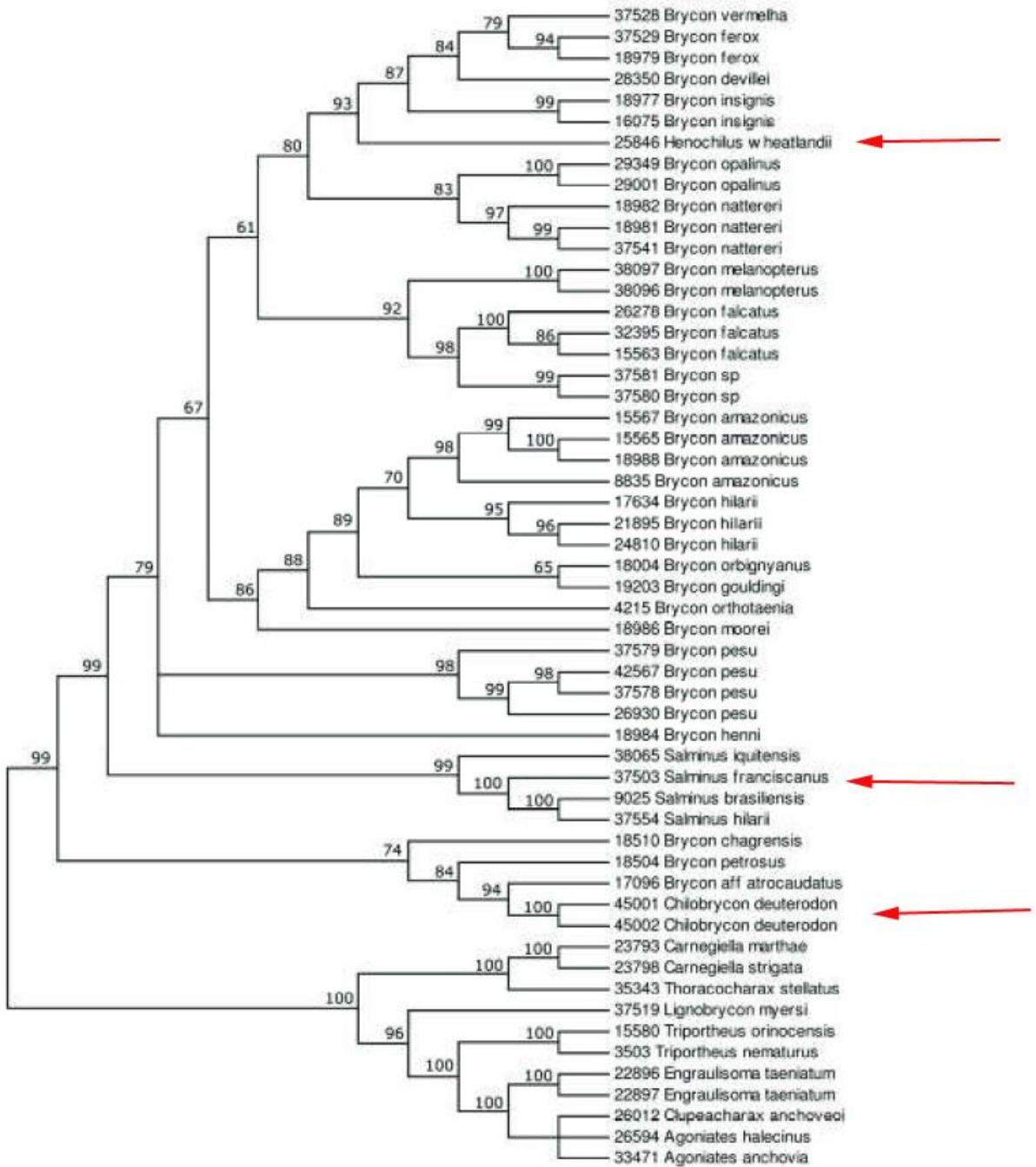


Figura 2: Cladograma mostrando as relações filogenéticas entre os Bryconinae (Modificado de Abbe 2011). As setas em vermelho indicam as estreitas relações filogenéticas de *Henochilus*, *Chilobrycon* e *Salminus* com espécies de *Brycon* o que faz deste um gênero parafilético.

Referências

1. Garman S (1890) On a genus and species of the characines (*Henochilus wheatlandii*, gen. N. Et sp. N.). Bull Essex Inst 22: 49–52.
2. Castro RMC, Vari RP, Vieira F, Oliveira C (2004) A phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). Copeia 3: 496–506.
3. Eigenmann CH, Myers GS (1929) The American Characidae. Mem Mus Comp Zool 43: 429–558.
4. Rosa RS, Menezes NA (1996) Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. Rev Bras Zool 13: 647–667.
5. Swerdlow J, (1998) Making sense of the millennium. Nat Geog 193: 2–33
6. Vieira F, Alves CBM, Santos GB (2000) Rediscovery and first record of *Henochilus wheatlandii* (Teleostei: Characiformes) a rare Neotropical fish, in rio Doce basin of southeastern Brazil. Ichthyol Explor Freshw 11: 201–206.
7. Géry J (1977) Characoids of the world. Neptune City: TFH Publications. 672 p.
8. Malabarba LR (1998) Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Characiformes: Characidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 193–233.
9. Zanata AM (2000). Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
10. Lima FCT (2003) Subfamily Bryconinae. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 174–181.

11. Eigenmann CH (1912). The freshwater fishes of British Guiana, including a study of the ecological grouping of species and the relation of the fauna of the plateau to that of the lowlands. Memoirs of the Carnegie Museum, 5: i-xxxii + 1-578, Pls. 1-103.
12. Géry J (1964). Poissons characoides nouveaux ou non signalés de l'Ilha do Bananal. Brésil Vie et Milieu 17: 448–475.
13. Uj A (1990). Etude comparative de l'ostéologie crânienne des poissons de La famille Characidae et son importance phylogénétique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
14. Howes GJ (1982) Review of the genus *Brycon* (Teleostei:Characoidei). Bull Br Mus Nat Hist (Zool) 43: 1–17.
15. 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.
16. Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí 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 11: 275.
17. Abbe TK (2011) Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
18. Ortí G (1997). Radiation of Characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. In: Kocher TD, Stephien CA, editors. Molecular Systematics of Fishes. London: Academic Press. pp: 219–243.

19. Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R (2005) Relationships among characiforms fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 36: 135–153.
20. Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 54: 498–511.
21. Faraut, T (2008) Addressing chromosome evolution in the whole-genome sequence era. *Chromosome Res* 16:5–16
22. White MJD (1978) Modes of Speciation. San Francisco: W. H. Freeman Company.
23. King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* 59: 1–6.
24. Searle, J.B. (1993) Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In Harrison RG, editor. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. New York: Oxford University Press. pp. 309-352.
25. Searle JB (1998) Speciation, chromosomes, and genomes. *Genome Res* 8: 1–3.
26. Rieseberg LH, Linder CR, Seilert GJ (1995) Chromosomal and genic barriers to introgression in *Helianthus*. *Genetics* 141: 1163–1171
27. Greenbaum IF, Reed MJ (1984) Evidence for heterosynaptic pairing of the inverted segment in pericentric inversion heterozygotes of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Cytogenet Cell Genet* 38: 106–111.
28. Hale DW (1986) Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericentric inversions of the Sitka deer mouse. *Chromosoma* 94: 425–432.
29. Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* 16: 351–358.

30. Navarro A, Barton NH (2003) Chromosomal speciation and molecular divergence-accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* 300: 321–324.
31. Faria R, Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25:660-669
32. King M (1993) Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge: Cambridge University Press.
33. Kirkpatrick M, Barton N (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* 173: 419–434.
34. Hoffmann AA, Reiseberg LH (2008) Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39:21–42.
35. Sites Jr. JW, Moritz C (1987) Chromosomal evolutions and speciation revisited. *Syst zool* 36: 153–174.
36. 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.
37. Souza IL, Santos-Silva LK, Venere PC, Moreira-Filho O (2008) Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* 39: 1036–1041.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Realizar a caracterização citogenética de *Henochilus weathlandii* do rio Santo Antônio, sub-bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- I. Cariotipar *Henochilus weathlandii*.
- II. Avaliar a existência de diferenças intraespecíficas quanto à variabilidade cariotípica, Ag-NORs, regiões heterocromáticas, 5S rDNA, 18S rDNA e regiões ricas em GC.
- III. Comparar os dados citogenéticos de *H. weathlandii* com os de outras espécies de *Brycon* disponíveis em literatura, a fim de compreender as relações filogenéticas desta espécie dentro da subfamília Bryconinae.

The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil

The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil

Priscilla C. Silva^{*}, Jorge A. Dergam

Laboratório de Sistemática Molecular - Beagle, Departamento de Biologia Animal,
Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais State, Brazil

^{*}E-mail: pricarola@gmail.com

3 Introduction

Henochilus wheatlandii is the only species of this genus. It was first collected by the Thayer expedition in 1865 and 1866. The first record was from the Mucuri River Basin [1], an isolated drainage area in eastern Brazil. The second record did not provide details of its location [2]. *Henochilus wheatlandii* was described in 1890 [3], but collection efforts in this type locality during the late 20th century were unsuccessful. Therefore, this species was officially considered to be at risk or extinct [4, 5]. In 1996, *H. wheatlandii* was collected in Preto do Itambé River, a tributary of the Santo Antonio River of the Doce River Basin in Minas Gerais State, Brazil. Based on this finding, the absence of new captures in the Mucuri River Basin was considered a record error of the type locality of the holotype [6], and the current distribution of *H. wheatlandii* now includes the Santo Antonio River Basin. Alternatively, this species could have become extinct in the type locality [6].

The systematics of *H. wheatlandii* have always been a matter of debate, and different authors have placed the species in different subfamilies [2, 7, 8]. Today, this genus is considered a member of the subfamily Bryconinae [9]. The close phylogenetic relationship of *H. wheatlandii* with members of this subfamily was corroborated with molecular [1, 10] and morphological data analyses [1]. The patterns obtained for the 16S ribosomal mitochondrial gene suggested a paraphyletic condition of the genera *Brycon* within Bryconinae [10], where *Brycon insignis* and *Brycon ferox* are more closely related to *H. wheatlandii* than other *Brycon*. Morphologically, the most evident difference between *Henochilus* and *Brycon* is the arrangement of premaxillary teeth in a double row in *Henochilus* and three rows in *Brycon* [1], a character variation that has been considered insufficient to justify the existence of the genus *Henochilus* [10].

Bryconins are indicators of high quality environmental habitat because they require rapid flowing waters with sandy substrate, highly oxygenated water, riparian vegetation and a moderate amount of nutrients [11]. These habitat conditions also restrict the distribution of *H. wheatlandii* to the Santo Antonio River Basin [6], although predatory exotics may also be a limiting factor for the presence of this species in the Doce River. Unfortunately, this species was rediscovered in a drainage area currently threatened by human activities such as mining, logging and hydroelectric projects [12].

Cytogenetic descriptions of Bryconinae are restricted to eight species that occur in the Amazon, São Francisco and Paraná watersheds [13] and one species in the Paraíba do Sul drainage. Historically, cytogenetic data on Ostariophysan fish have allowed the identification of cryptic species [14], the characterization of populations [15, 16], and the formulation of phylogenetic and phylogeographic hypotheses [17-19]. This study reports the first cytogenetic data for *H. wheatlandii* and compares the results with other species of Bryconinae from a biogeographic and phylogenetic perspective.

4 Materials and methods

Nineteen individuals, six females, eleven males and two juveniles, were collected in the Santo Antonio River, a sub-basin within the Doce River Basin ($S19^{\circ}13'858''$ $W43^{\circ}04'905''$) in Ferros municipality, Minas Gerais State, Brazil. The specimens were transported to the laboratory and anaesthetised with clove oil [20]. Following dissection, mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior kidney, using the conventional air-drying method [21]. Chromosomes were analysed with silver nitrate staining [22] to visualise the nucleolar organiser regions (Ag-NOR) in addition to the standard Giemsa method. C-banding was used to detect C-positive heterochromatin [23]. Chromosome guanine-cytosine (GC) rich regions were

identified using chromomycin A₃ (CMA₃) fluorescence staining [24]. FISH was performed according to Pinkel and colleagues [25] using 18S rDNA [26] and 5S rDNA [27] probes. The probes were labelled by nick translation with biotin-14-dATP. Signal detection and probe amplification were performed using conjugated avidin-fluorescein isothiocyanate (FITC) and anti-avidin-biotin, and the metaphases were analysed with an epifluorescence microscope. The chromosomal images were captured using CoolSNAP-Pro software. The chromosomes were measured using Image Pro Plus® and classified following Levan and colleagues [28]. Voucher specimens were deposited in the João Moojen de Oliveira Museum of Zoology in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil (MZUFV3195, MZUFV3744, MZUFV3791, MZUFV3821, MZUFV3827, and MZUFV4011). Collecting permit SISBIO14975-1 was issued to Prof. Jorge A. Dergam.

5 Results

All specimens had $2n = 50$ chromosomes and a karyotypic formula of 26m + 12sm + 12st (see Figure 1a and S1), with no differences observed between males and females. At least 40 Giemsa-stained, five C-banded, two Ag-NOR, two CMA₃ and two FISH metaphases were analysed for each specimen. The mean values of the arm ratios were 1.28 - 1.61 (s.e. 0.002 - 0.2) for metacentrics; 1.90 - 2.67 (s.e. 0.05 - 0.2) for submetacentrics, and 3.24 - 4.14 (s.e. 0.04 - 0.2) for subtelocentrics. One pericentromeric and two telomeric heterochromatic blocks were visible in the largest pair of metacentric chromosomes of *H. wheatlandii*. Pericentromeric heterochromatin was evident in metacentric chromosome pairs 2 and 9 and submetacentric chromosome pairs 14 and 18, whereas the largest subtelocentric chromosomes (pair 20) presented conspicuous telomeric and pericentromeric heterochromatic blocks. Pericentromeric

blocks predominated in most subtelocentrics, except for pairs 22 and 23 (see Figure 1b).

At least five C-banded metaphases were analysed for each specimen.

Sites marked with Ag-NOR, CMA₃, and 18S rDNA sites were telomeric and identified in the same first pair of subtelocentric chromosomes (see Figure 2). The 5S rDNA regions were distributed in the short arm of subtelocentric chromosome pair 24 and were congruent with heterochromatic blocks (see Figures 1b and 2c).

6 Discussion

The observed 2n = 50 metacentric, submetacentric, and subtelocentric chromosomes of *H. wheatlandii* are characteristic of other Bryconinae [29-33, 13]. The absence of telocentric chromosomes may represent an apomorphy within the taxon, despite some variation in karyotypic formulae. This karyotypical structure is shared with species of the genus *Salminus* [34], suggesting a close phylogenetic relationship with Bryconinae, a pattern supported by molecular data [35-37]. In this context, karyological evidence also adds support for the existence of the family Bryconidae, as suggested by Oliveira and colleagues [37]. However, from a morphological standpoint, *Salminus* species are still considered to be *incertae sedis* within Characidae [9]. On the other hand, the presence of a metacentric chromosome pair as the largest of the complement in *H. wheatlandii* and other Bryconinae [33] is characteristic of the family Characidae [38, 39].

The presence of pericentromeric and telomeric heterochromatic blocks on opposite arms of the first pair of metacentric chromosomes of *H. wheatlandii* differs from the equilocal pattern observed in other Bryconinae, and thus has great relevance for understanding the karyotypical evolution of this species. Equilocal heterochromatic markings are common in Bryconinae species and considered to be plesiomorphic within

this taxon [30]. This pattern has been reported in *Brycon orthotaenia*, *Brycon hilarii*, *Salminus hilarii* [30], and *Brycon amazonicus* [13]. The different pattern observed in *H. wheatlandii* suggests the occurrence of paracentromeric inversions in this species. To the best of our knowledge, this is the first record of paracentromeric inversions in Characidae. Chromosomal inversions are crucial for the reproductive isolation of populations [40] and contribute to the speciation process [41-44]. High levels of variability in heterochromatin patterns of *Brycon* were considered to be relevant factors in chromosome evolution and differentiation of the Bryconinae [29, 30], and the presence of large heterochromatic blocks in the first pair of submetacentric chromosomes [13, 29, 30], probably represents a plesiomorphic character state for the subfamily Bryconinae. Based on overall patterns of heterochromatin distribution, Margarido and Galetti Jr. [29] proposed that *Brycon* species might be separated into two groups: the first characterised by predominantly pericentromeric heterochromatin in submetacentric chromosomes; and the second diagnosed by telomeric markings in metacentric chromosomes. *Henochilus wheatlandii* exhibits a third pattern, with markers prevalent in the pericentromeric region of subtelocentric chromosomes. This characteristic seems to be an autapomorphy for this taxon.

The physical congruence of 18S probe sites, CMA₃ fluorescence, and Ag-positive NOR locations in *H. wheatlandii* was similar to patterns observed for *Brycon falcatus*, *Brycon cephalus*, *B. hilarii*, *Brycon orbignyanus*, *B. orthotaenia*, *Brycon insignis*, and *B. amazonicus* [31, 13], indicating the presence of a single 18S rDNA locus in Bryconinae. However, the 18S rDNA site occurred on the subtelocentric chromosome pair in *H. wheatlandii*, instead of the first pair of submetacentric chromosomes as in all *Brycon* species. Also, the 5S rDNA site in *H. wheatlandii* was found in a pair of subtelocentric chromosomes, whereas in *Brycon* species the 5S rDNA

occurs in submetacentric chromosomes [32, 13]. These differences indicate a long independent karyotypic evolutionary history of *H. wheatlandii*. *Henochilus wheatlandii* also showed congruence of the 5S rDNA sites with heterochromatic blocks, which is a common characteristic of *Brycon* [29, 32] suggesting that this is plesiomorphic trait for Bryconinae.

The occurrence of three heterochromatic karyotype patterns in Bryconinae is partially congruent with some phylogeographic clades based on data from the mitochondrial 16S rDNA gene [10] and is also consistent with the morphological groups proposed by Howes in 1982 [45] (see Figure 3). Based on molecular data, Hilsdorf and colleagues [10] obtained some well-supported molecular clades. Within the eastern coastal clade, *H. wheatlandii* is the sister species of *Brycon insignis* and *Brycon ferox*. The C-banding patterns of *B. insignis* were interpreted by Margarido and Galetti [29] as an instance of the second heterochromatic pattern [29]. However, this species, like *H. Wheatlandii*, has a high number of subtelocentrics with heterochromatic blocks and the absence of equilocal heterochromatic blocks in the first chromosome pair, which might be the result of a paracentromeric inversion in the ancestor of both species (see Figure S2). Differences in the marking locations of 5S rDNA sites sets *H. wheatlandii* apart from all other Bryconinae. Whereas in this species 5S rDNA markings were located in a small subtelocentric chromosome, the probe only occurs in submetacentric chromosomes in species endemic to other basins: *Brycon orthotaenia* (São Francisco River), *B. hilarii* (Paraguay River), *B. orbignyanus* (La Plata River), *B. cephalus* (Amazon drainage), and *Brycon* sp. (Araguaia River, a specimen collected by Wasko [32]). 5S rDNA markings on submetacentrics also characterise *Brycon amazonicus* (from the Amazon and Orinoco basins) and *B. falcatus* (from the Amazon, Orinoco, and Guyana/Suriname basins) [32, 46]. The presence of 5S rDNA in two pairs

of submetacentric chromosomes in *B. insignis* and a small subtelocentric chromosome in *H. wheatlandii* suggests a high level of variation of this ribosomal gene in species that occur in eastern Brazil. This may be the result of a relatively longer geological isolation of the eastern basins compared with the other drainage areas of the Neotropical region, which have a complex history of fragmentation and connections [47].

Castro and colleagues [1] reviewed the historical changes of the systematic position of *H. wheatlandii*. The species was initially considered by Garman [3] as closely related to *Tetragonopterus* and *Scisor*. Later, Eigenmann and Myers [2] viewed *H. wheatlandii* as “an aberrant member of the Tetragonopterinae” and Géry [7] added the species to the Cheirodontinae. Malabarba [8] redefined the Cheirodontinae and placed it in *incertae sedis* condition within Characidae. Currently, due to the presence of premaxillary large teeth and symphysial dentary teeth, the species is considered morphologically within Bryconinae [9]. Molecular-based studies show that *H. wheatlandii* is closely related to *Brycon insignis* [10, 37] and *Brycon ferox* [10], suggesting the need to include *Henochilus* within *Brycon*. Aside from this caveat, the inclusion of *H. wheatlandii* within *Brycon* will keep this species as a clear example of adaptive radiation [48].

The unique cytogenetic features of *H. wheatlandii* compared to other species of Bryconinae from continental biogeographical units suggest this species (possibly together with other species from the eastern drainage areas) is a separate phylogenetic unit that faces high extinction risks.

Supporting Information

Figure S1 Chromosome spread from karyotypes presented in this work. Conventional staining (Giemsa) (a); C-banding protocols (b); Ag-NOR banding protocols (c);

chromomycin A3 (d), and fluorescent in situ hybridisation using 18S (pink) and 5S (green) probes (e).

Acknowledgements

Nicholas J. Walker helped with laboratory work. To Asia Science for English revision and editing this manuscript. Further revisions were done by Journal Editors of America, LLC.

7 References

- 1 Castro RMC, Vari RP, Vieira F, Oliveira C (2004) A phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). *Copeia* 3: 496–506.
- 2 Eigenmann CH, Myers GS (1929) The American Characidae. *Mem Mus Comp Zool* 43: 429–558.
- 3 Garman S (1890) On a genus and species of the characines (*Henochilus wheatlandii*, gen. N. Et sp. N.). *Bull Essex Inst* 22: 49–52.
- 4 Rosa RS, Menezes NA (1996) Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Rev Bras Zool* 13: 647–667.
- 5 Swerdlow J, (1998) Making sense of the millennium. *Nat Geog* 193: 2–33
- 6 Vieira F, Alves CBM, Santos GB (2000) Rediscovery and first record of *Henochilus wheatlandii* (Teleostei: Characiformes) a rare Neotropical fish, in rio Doce basin of southeastern Brazil. *Ichthyol Explor Freshw* 11: 201–206.
- 7 Géry J (1977) Characoids of the world. Neptune City: TFH Publications. 672 p.
- 8 Malabarba LR (1998) Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Characiformes: Characidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena

- ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 193–233.
- 9 Lima FCT (2003) Subfamily Bryconinae. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 174–181.
- 10 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.
- 11 Botero-Botero A, Ramírez-Castro H (2011) Ecología trófica de la Sabaleta *Brycon henni* (Pisces:Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca. Rev MVZ Cordoba 16: 2349–2355.
- 12 Vieira FC, Alves CBM (2001) Threatened fishes of the world: *Henochilus wheatlandii* Garman, 1890 (Characidae). Environ Biol Fish 62: 414.
- 13 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.
- 14 Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão JN, Fenocchio AS (2004) Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). Heredity 93: 228–233.
- 15 Dergam JA, Bertollo LAC (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. Genet Mol Biol 13: 755–756.

- 16 Jacobina UP, Paiva E, Dergam JA (2011) Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 9: 325–333.
- 17 Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94: 180–186.
- 18 Santos U, Volcker CM, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva SR, Dergam JA (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *J Fish Biol* 75: 2326–2343.
- 19 Kavalco KF, Pazza R, Brandão KO, Garcia C, Toledo LFA (2011) Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* *Astyanax* aff. *Bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Gen Res* 134: 108–119.
- 20 Inoue LAKA, Neto CS, Moraes G (2003) Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciênc rural* 33: 943–947. .
- 21 Bertollo LAC, Takahashi C, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 103–120.
- 22 Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
- 23 Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306.
- 24 Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and

- DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenet Cell Genet* 60: 229–235.
- 25 Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938.
- 26 Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009) Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet* 10: 34.
- 27 Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F; Galetti Jr. PM (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133–141.
- 28 Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 1: 201–220.
- 29 Margarido VP, Galetti Jr. PM (1996) Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228.
- 30 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.
- 31 Wasko AP, Galetti Jr. PM (2000) Mapping 18s ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hibridization (FISH). *Genet Mol Biol* 23: 135–138.
- 32 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.
- 33 López DD, Palacio GV, Cortés TR, Angel MO (2008) Caracterización citogenética del pez neotropical *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Rev biol trop* 56: 1619–1628.

- 34 Souza IL, Santos-Silva LK, Venere PC, Moreira-Filho O (2008) Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* 39: 1036–1041.
- 35 Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R (2005) Relationships among characiforms fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 36: 135–153.
- 36 Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 54: 498–511.
- 37 Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí 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* 11: 275.
- 38 Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenet Genome Res* 109: 497–501.
- 39 Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF (2009) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* 136: 135–139.
- 40 Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinhorsdottir V, Masson G (2005) A common inversion under selection in Europeans. *Nature Rev Genet* 37: 129–137.
- 41 Hoffmann AA, Rieseberg LH (2008) Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39: 21–42.

- 42 Kirkpatrick M, Barton N (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* 173: 419-434.
- 43 White MJD (1978) Modes of speciation. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- 44 King M (1993) Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge: Cambridge University Press.
- 45 Howes GJ (1982) Review of the genus *Brycon* (Teleostei:Characoidei). *Bull Br Mus Nat Hist (Zool)* 43: 1-17.
- 46 Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs.
- 47 Lundberg GJ, Marshall LG, Horton JGB, Malabarba MCSL, Wesselingh F (1998) The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical south American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 13–48.
- 48 Albert JS, Petry P, Reis RE (2011) Major biogeographic and phylogenetic patterns. In: Albert JS, Reis RE, editors. Historical of neotropical freshwater fishes. Los Angeles: University of California press. pp. 21–58.

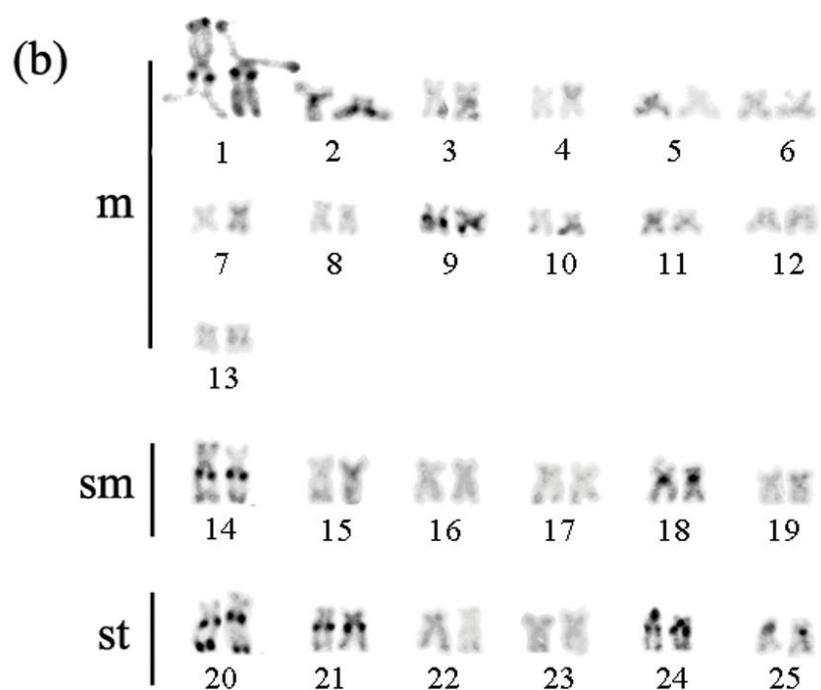
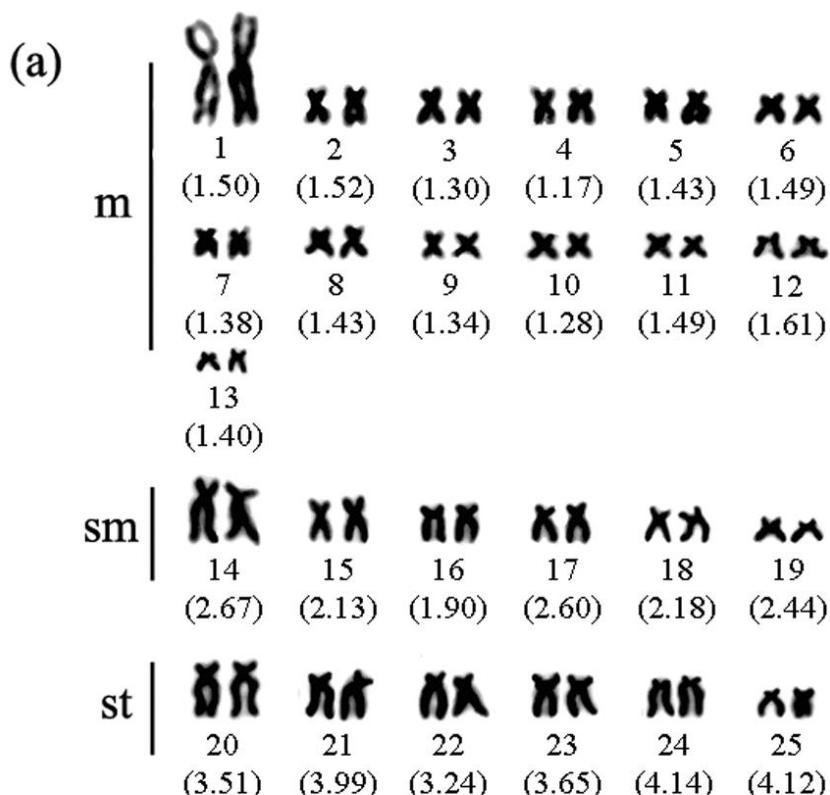


Figure 1 The karyotype of *Henochilus wheatlandii* from the Santo Antonio River. Conventional staining (Giemsa) (a) and heterochromatic marks obtained by C-banding protocol (b). Mean values of arm ratios are in parentheses (sample size = 40).

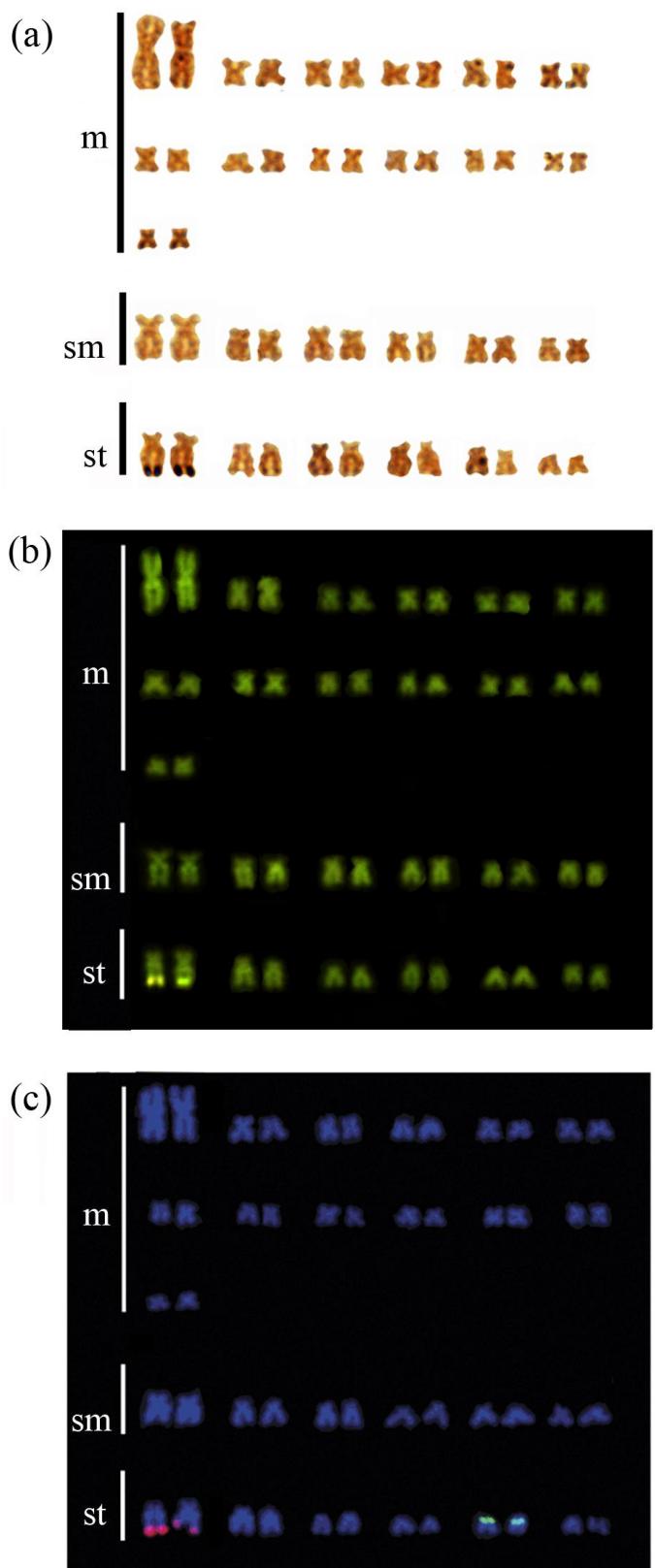


Figure 2 Cytogenetic marks in the same chromosome pair of *Henochilus wheatlandii* karyotype. Ag-NOR banding (a), chromomyycin A₃ (b) and fluorescent *in situ* hybridisation using 18S (pink) and 5S (green) probes (c).

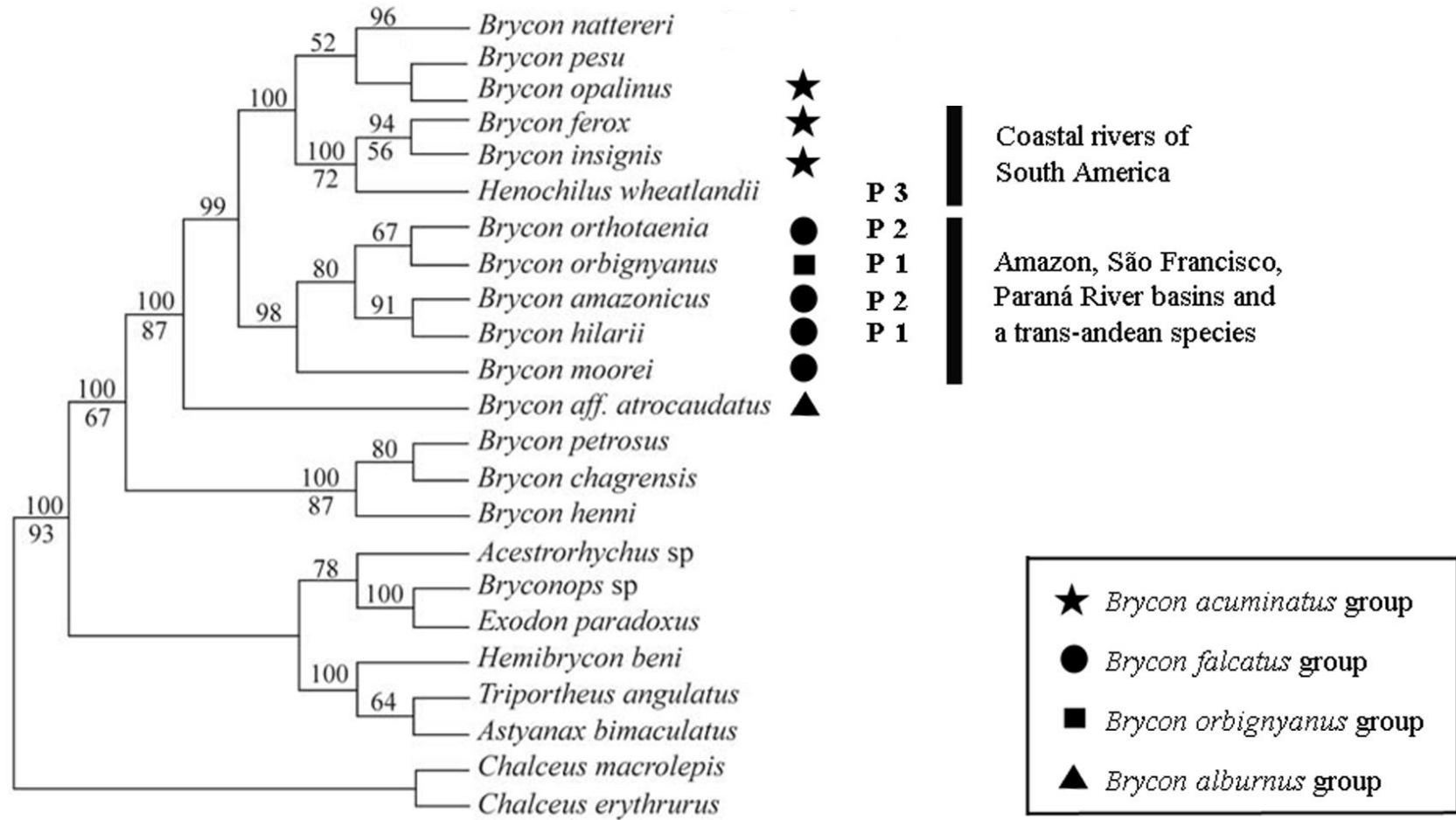


Figure 3 Molecular data-based phylogenetic hypothesis for some Bryconinae. Numbers above branches are Bayesian posterior probabilities expressed in percentage, numbers below branches indicate maximum likelihood analyses bootstrap values (modified from Hilsdorf and colleagues [10]). Morphological groups proposed by Howes [45]: stars for *Brycon acuminatus*, circles for *Brycon falcatus*, squares for *Brycon orbignyanus*, and a triangle for *Brycon alburnus*. P1 and P2, heterochromatic patterns proposed by Margarido and Galetti [29]. P3 is a new pattern recorded in *Henochilus wheatlandii*. Bars indicate geographical distribution.

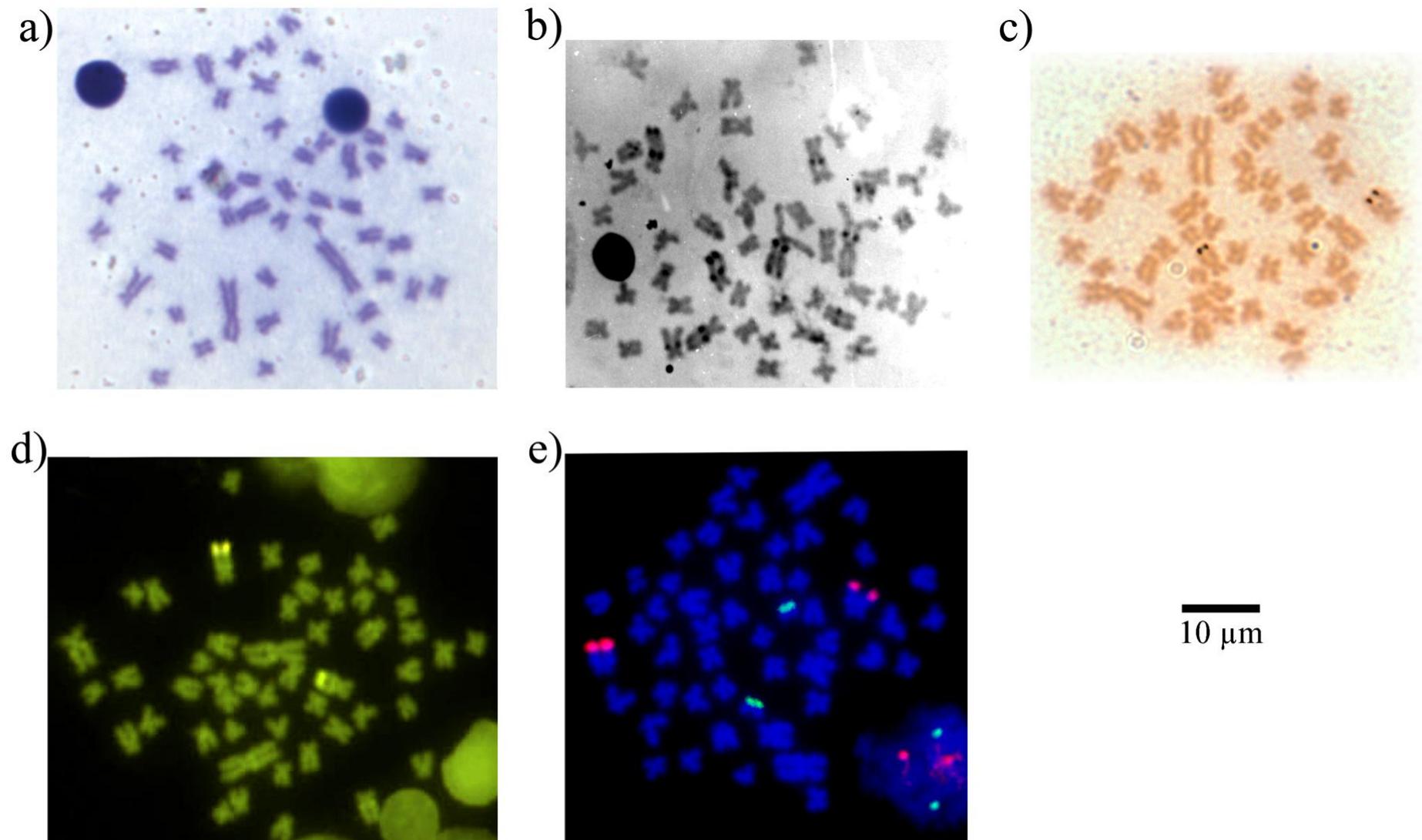


Figure S1 Chromosome spread from karyotypes presented in this work. Conventional staining (Giemsa) (a); C-banding protocols (b); Ag-NOR banding protocols (c); chromomycin A3 (d), and fluorescent in situ hybridisation using 18S (pink) and 5S (green) probes (e).

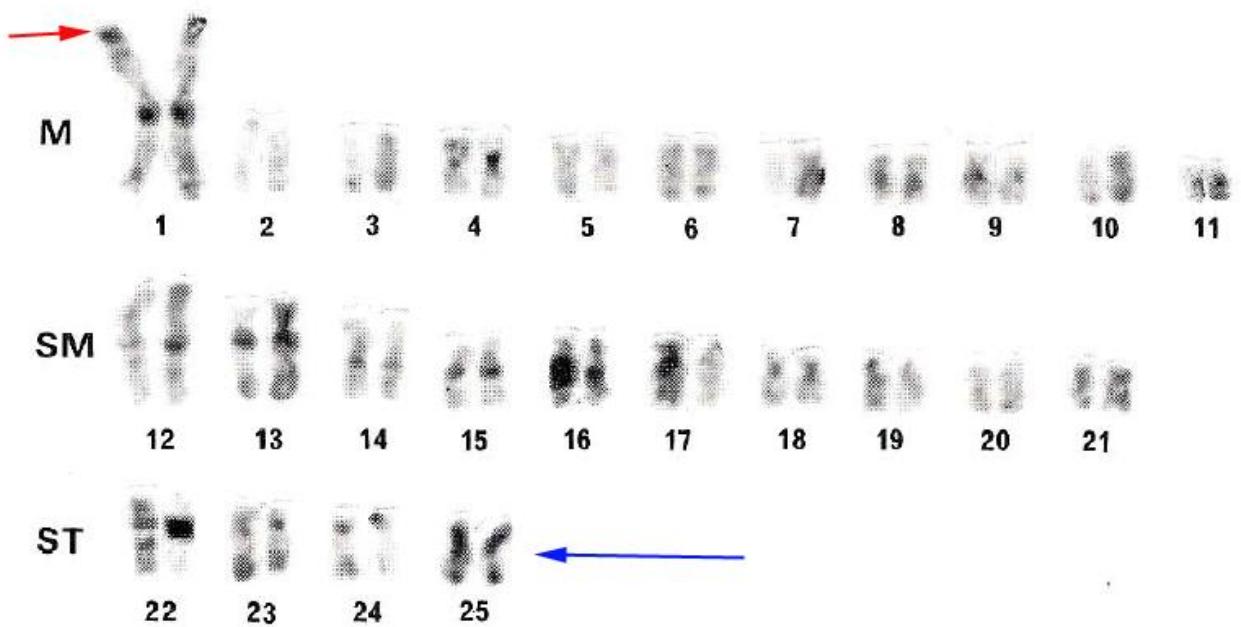


Figure S2 Heterochromatic patterns found in *Brycon insignis* from the Paraíba do Sul River Basin (modified from Margarido and Galetti Jr. 1996). Red arrow indicates a likely parecentric inversion similar to that found in *Henochilus wheatlandii*. Blue arrow indicates marks on all subtelocentric chromosomes not explained by the original author.