
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALLAN PIERRE BONETTI POZZOBON

**Filogeografia e Estrutura Populacional de *Astyanax paranae*
(PISCES: CHARACIDAE) na Bacia do Rio Paranapanema.**



Rio Claro
2009

ALLAN PIERRE BONETTI POZZOBON

**Filogeografia e Estrutura Populacional de *Astyanax paranae*
(PISCES: CHARACIDAE) na Bacia do Rio Paranapanema.**

Orientador: Anderson Luis Alves

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2009

597
P894f Pozzobon, Pierre Allan Bonetti
 Filogeografia e estrutura populacional de *Astyanax*
 paranae (PISCES: CHARACIDAE) na Bacia do rio
 Paranapanema / Pierre Allan Bonetti Pozzobon. - Rio Claro :
 [s.n.], 2009
 47 f. : il., figs., tabs.

 Trabalho de conclusão (Licenciatura e Bacharelado -
 Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências
 Orientador: Anderson Luis Alves

 1. Peixe. 2. Genética de Peixes. 3. Genética Molecular. 4.
 Conservação Genética. 5. Citocromo B. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

ÍNDICE

Resumo.....	05
1. Introdução.....	07
1.1 A Bacia do Paranapanema.....	09
1.2 Filogeografia e Estudos Evolutivos em Peixes Neotropicais.....	11
1.3 O gênero <i>Astyanax</i> Baird e Girard, 1854: Aspectos ecológicos, taxonômicos e genéticos.....	13
1.4 Justificativa.....	16
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e métodos.....	20
3.1 Materiais.....	20
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Extração de DNA.....	21
3.2.2 Amplificação do DNA.....	23
3.2.3 Limpeza do produto de PCR para Sequenciamento.....	24
3.2.4 Análise das seqüências.....	25
4. Resultados.....	27
4.1. Composição nucleotídica das seqüências do gene Citocromo B.....	27
4.2. Análises filogenéticas das populações de <i>Astyanax paranae</i>	29
4.3. Distância genética entre as populações de <i>Astyanax paranae</i> e espécies relacionadas.....	33
4.4. Relógio molecular.....	34
5. Discussão.....	39
5.1 Clado <i>Astyanax altiparanae</i>	39
5.2 Clado <i>Astyanax fasciatus</i>	39
5.3 Clado <i>Astyanax paranae</i>	39
5.4 Clado <i>Astyanax bockmanni</i>	40
6. Conclusão.....	42
7. Referências Bibliográficas.....	44

RESUMO

Atualmente, crescentes esforços vêm sendo desenvolvidos no sentido de se caracterizar a ictiofauna Neotropical de riachos do ponto de vista taxonômico e sistemático, porém a estrutura genética destas populações ainda é pouco conhecida, sendo escassos os estudos sobre filogeografia dessa ictiofauna. Considerando que *Astyanax paranae* representa a única espécie do complexo *scabripinnis* na bacia do Alto rio Paraná, a ausência de dados moleculares populacionais e as evidências citogenéticas e morfológicas de que esta espécie não represente uma unidade monofilética, faz-se necessário um amplo estudo filogeográfico e filogenético em *Astyanax paranae*. O presente projeto teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética em populações de *Astyanax paranae* e estabelecer as relações filogenéticas filogeográficas entre as linhagens mitocondriais na bacia do rio Paranapanema. As análises foram realizadas através da análise de sequências do DNA mitocondrial a partir do gene Citocromo B (cyt *b*) que foram completamente seqüenciados. Foram analisadas 8 populações de *Astyanax paranae*: 2 populações da bacia do rio Pardo, 1 Córrego Hortelã, 2 Véu de Noiva, Botucatu/SP; 4 populações da bacia do rio Tibagi, 1 população Maria da Serra/PR; 1 Ponta Grossa/PR, 1 Cambé/PR, 1 Castrolanda/PR; 1 população do rio Itapetininga, rio Itapetininga, Itapetininga/SP.; o número de indivíduos por população variou de 1 a 5. Como grupo externo foram analisados 1 população de *Astyanax altiparanae* com 3 indivíduos (Véu de Noiva pt2, Botucatu/SP); 1 população de *Astyanax fasciatus* com 5 indivíduos (região de Itapetininga/SP) e 1 população de *Astyanax bockmanni* com 2 indivíduos (Véu de Noiva pt2, Botucatu/SP); num total de 39 indivíduos. Entre as 8 populações analisadas se inclui a população da localidade tipo na bacia do rio Tibagi (Castrolanda/PR). As análises e alinhamento das seqüências foram realizadas nos programas Multalin, *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*, e DAMBE, *Data analysis in molecular biology and evolution*. As análises filogenéticas foram conduzidas através do uso do programa MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Os resultados obtidos auxiliarão na melhor compreensão sobre a taxonomia e historia evolutiva do gênero, que ainda apresenta muitas espécies consideradas *insertae sedis*.



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Diversas razões fazem dos peixes um ótimo objeto de estudos, desde fatores biológicos como as mais impressionantes especializações de morfologia, fisiologia e comportamento (Purdom, 1993) criando uma diversidade imensa, mas frágil, que pode ser facilmente perdida, até fatores econômicos por apresentarem uma considerável importância para a sobrevivência do homem, na forma de alimentos e na geração de renda. Porém essa relação está sendo ameaçada por nós mesmos, enquanto sistemas de água doce provem bens e serviços, importantes e únicos, para a sociedade, eles são ameaçados por diversas atividades humanas, incluindo engenharia, poluição e super exploração de recursos naturais (Vrijenhoek 1998). Recentemente, houve um decréscimo global nos estoques pesqueiros (Garcia & Grainger, 2005; Pauly *et al.*, 2005) e a situação, atualmente, dos mesmos é a seguinte: Os pesqueiros superexplorados, totalmente explorados e exauridos que eram 69% em 1995 aumentaram para 75% em 2002 e somente 1% do estoque está em estado de recuperação (FAO, 2002; Ormerod, 2003). Essa situação é encontrada em estoques pesqueiros brasileiros (Vasconcellos & Gasalla, 2001).

Outras atividades humanas, como inundações, canalizações, regulação das águas e irrigação, modificam o ciclo hidrológico (Giller, 2005). Muitas dessas atividades obstruem rios, modificam habitats, impedem animais aquáticos de chegar nos habitats de cabeceira e isolam populações da parte alta dos rios. Populações que estão fisicamente e geneticamente isoladas sofrem com a diminuição do tamanho populacional e intercruzamento, que podem aumentar o risco de extinção (Shaffer 1981; Brook *et al.* 2002; Morita *et al.* 2009).

Essas ações impõem uma forte pressão nesses organismos e no ambiente, assim sendo o conhecimento detalhado de aspectos da biologia e genética desses organismos se faz necessário, já que as análises de genética de populações em níveis e abaixo de espécies são pontos de partida importantes para a conservação de espécies e exploração sustentável. (Ovenden *et al.* 2009). Através da análise de marcadores moleculares, a genética de populações revela novidades na divergência populacional e dispersão local. Isso nos auxilia a fazer inferências sobre a conectividade entre populações e viabilidade evolucionária, e isso tem importantes aplicações nos manejos de conservação (Conservation Genetics; e.g. Frankham 1996; Latta 2008).

O estudo da variabilidade genética não só é de grande importância para medidas de conservação, como também de criação de peixes, que depende do conhecimento sobre a quantidade de variabilidade existente em uma unidade reprodutiva local (Carvalho, 1993).

Peixes primariamente de água doce provem excelentes oportunidades para estudar questões biogeográficas. A distribuição dos mesmos é restrita a sistemas de drenagem de lagos e rios, portanto sua evolução e dispersão esta relacionada com eventos paleogeográficos das bacias. Eventos históricos de conexão de sistemas hidrográficos, resultado de atividades geológicas, podem moldar a estrutura genética de populações de peixes em bacias associadas (e.g. Bermingham & Martin, 1998; Durand *et al.*, 1999; Pfrender *et al.*, 2004).

A região Neotropical é a mais rica em numero de peixes de água doce, e pode representar 25% de todas as espécies deste grupo distribuídas pelo mundo (Schaefer, 1998). A Convenção de Diversidade Biológica reconhece 4475 espécies de peixes de água doce Neotropicais e 1550 espécies ainda não descritas, totalizando 6025 espécies, distribuídas em 71 famílias de 25 ordens diferentes (Reis *et al.*, 2003). O número de espécies, no entanto, pode chegar a 8000 de acordo com outras estimativas (Schaefer, 1998; Vari & Malabarba, 1998).

A chamada ictiofauna de riacho, que abrange peixes com porte menor que 15cm, é a que está mais ameaçada pelas alterações humanas, pois esses peixes apresentam um alto grau de endemismo correspondendo a 50% das espécies da ictiofauna de agua doce descritas na América do sul (Castro *et al.*, 2003). Estas espécies são dependentes da vegetação ripária para a alimentação, abrigo e reprodução, por isso estão ameaçadas por atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas associados a atividades agrícolas intensivas (Castro *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2005).

Ainda é pequeno o número de trabalhos utilizando dados moleculares para interpretar a história filogenética dos peixes Neotropicais, mas eles indicam que a taxonomia dos peixes de água doce desta região, muitas vezes distorce nossa visão de relacionamentos ao nível de espécie (Perdices *et al.*, 2002). Portanto o estudo da sistemática, evolução e ecologia das espécies de peixes de pequeno porte é o grande desafio da ictiologia Neotropical do século 21 (Castro *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2005).

Dessa forma, o grupo de peixes de pequeno porte, tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua fragilidade e diversidade. Varias pesquisas já estão em andamento como, por exemplo, o desenvolvimento do projeto Temático “Diversidade de peixes de riachos e cabeceiras da bacia do Alto rio Paraná no estado de São Paulo, Brasil” dentro do programa BIOTA-FAPESP, que identificou novas espécies (6 para a bacia do Tietê, 8 para a

bacia do Paranapanema e 4 para a bacia do rio Grande) além de várias espécies com *status* taxonômico indeterminado, principalmente no gênero *Astyanax* (Castro *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005).

Assim a necessidade no aprofundamento das pesquisas em relação ao grupo de peixes de pequeno porte é evidente e mais estudos genético-moleculares enfocando aspectos filogeográficos e filogenéticos para esses peixes precisam ser desenvolvidos. Tais estudos são importantes ferramentas para a identificação molecular de novas espécies numa área de reconhecido endemismo e subestimativa da ictiofauna, justificando assim a elaboração da presente proposta.

1.1 A Bacia do Paranapanema

Uma bacia hidrográfica pode ser entendida como uma área onde a precipitação é coletada e conduzida para seu sistema inter-relacionado de drenagem natural, onde o movimento da água superficial inclui todos os usos dela e do solo, existentes na localidade (Magalhães, 1989).

O Rio Paranapanema nasce na Serra de Paranapiacaba, aproximadamente 900 m de altitude, e deságua no Rio Paraná após percorrer cerca de 500 km e receber como tributários principais os Rios Itararé, Pardo, Tibagi e Pirapó (Ziesler & Ardizzone, 1979), fazendo a maior parte da fronteira entre os Estados de São Paulo e Paraná. Sua bacia de drenagem possui aproximadamente 109.600 km² (Sampaio, 1944), estendendo-se por três grandes unidades do relevo brasileiro: o Planalto Atlântico, a Depressão Periférica e o Planalto Arenítico Basáltico Ocidental (Ab'Saber, 1956). A Serra de Paranapiacaba, onde se situa sua nascente, constitui o divisor de águas das bacias pequenas voltadas para a costa, do Ribeira de Iguape, do Paraíba do Sul e do Paraná, com altitudes de até 1.100 m e afloramentos de rochas pré-cambrianas constitutivas.

Deixando a serra, os afluentes da margem direita da bacia do Rio Paranapanema seguem por uma faixa de terrenos sedimentares carbonífero-permianos dos grupos Itararé e Passa Dois e, a partir das proximidades da cidade de Piraju, correm pelo grande domínio dos derramamentos basálticos do final do Mesozóico, a chamada formação Serra Geral. Em seu trecho final, das proximidades da cidade de Teodoro Sampaio até seu encontro com o rio Paraná, drena os sedimentos cretáceos da formação Caiuá (Instituto Geográfico e Geológico, 1974).

O clima geral nas porções superior e média da bacia é tropical subquente e superúmido, com subseca, enquanto que na porção inferior é tropical subquente úmido, com um a dois meses secos. De modo geral, há pelo menos um mês por ano com temperatura média inferior a 18°C e a temperatura média no mês mais quente é superior a 22°C. A maior parte da bacia está inclusa nas isoietas de 1.200 mm anuais (Nimer, 1989). No passado recente, a área da bacia de drenagem do Rio Paranapanema era majoritariamente coberta pelos Bosques Subtropicais Decíduos e Mesofíticos do Brasil Oriental e Meridional (=Floresta Estacional Semidecidual) (Huek & Seibert, 1981). Sua ictiofauna, até o momento, foi pouco ou nada estudada, sendo os poucos trabalhos efetivamente publicados – com exceção de Henry *et al.* (1994), Uieda *et al.* (1997), Casatti *et al.* (2001) e Casatti (2002), lidando com a fauna de riachos - limitados à fauna de porte médio a grande sobrevivente nos reservatórios (p. ex. Carvalho *et al.*, 1998). Infelizmente, do ponto de vista ambiental, o Rio Paranapanema foi bastante impactado pela ação antrópica relativamente recente.

Seu canal principal atualmente consiste de uma sucessão de barragens (UHEs Jurumirim, Chavantes, Salto Grande, Canoas II, Canoas I, Capivara, Taquaruçu e Rosana), com uma potência total instalada de 2.304 MW, alagando aproximadamente 1.800 km² de sua bacia de drenagem (www.dukeenergy.com.br/pt/links.asp, 08.ix.2001). A construção de barragens para hidroelétricas é uma das mais sérias mudanças ambientais para espécies habitantes tanto da terra como da água. O reservatório pode causar modificações nos meios de dispersão de varias espécies de peixes migratórios (Agostinho *et al.*, 1992) e, sob certas circunstancias, pode levar a extinção de espécies que não conseguem se adaptar a esse tipo de mudança (Godinho & Godinho, 1994).

Barragens podem promover quebras no processo de fluxo gênico entre populações de organismos aquáticos, com subsequente alterações na frequência de genes de espécies de peixes (Awise & Felley, 1979; Revaldaves *et al.*, 1997; Neeras & Spruell, 2001). Redução na dispersão e fluxo gênico podem em tempos, alterar a relativa proporção dos componentes intra- e inter- populacionais de diversidade (Vrijenhoek, 1998).

Da vegetação original da área estudada no presente trabalho, praticamente nada sobrou, sendo os Parques Estaduais de Intervales e Morro do Diabo (Inventário Florestal do Estado de São Paulo, 1993), os únicos fragmentos contínuos de floresta com porte significativo, sendo a área desmatada convertida primariamente a atividades agropecuárias.

1.2 Filogeografia e Estudos Evolutivos em Peixes Neotropicais

O termo Filogeografia foi proposto por Avise *et al.* (1987), a partir das observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies apresentam localização geográfica específica, introduzindo uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações. Com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de seqüências entre eles, Avise (2000) propôs e discutiu cinco categorias filogeográficas, considerando aspectos da divergência de seqüências entre populações alopátricas e simpátricas.

Na categoria I, estão incluídos os casos em que são observadas linhagens de mtDNA bastante divergentes, em geral com valores superiores a 1-2%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria II, estão as linhagens de mtDNA divergentes que ocorrem na mesma área geográfica (Simpatria). Na categoria III, ocorrem linhagens de mtDNA com baixos valores de divergência de seqüências, em geral menores que 1%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria IV, estão as linhagens de mtDNA com divergência de seqüências muito baixas ou praticamente nulas e que estão geograficamente localizados (Simpatria, com grande área de distribuição). Na categoria V, são encontradas linhagens pouco divergentes exibindo uma separação espacial parcial, sendo intermediária entre as categorias III e IV. De maneira geral, a presença de clones de mtDNA filogeneticamente próximos, reflete a ocorrência de fluxo gênico (ao menos, via materna), ou a presença de barreiras recentes, enquanto descontinuidades genéticas mais profundas, podem evidenciar separações populacionais historicamente mais antigas (Avise, 2000).

Ainda de acordo com Avise (2000), cerca de 56% (27) das espécies de peixes de água doce analisadas até aquele momento apresentaram padrão filogeográfico de estruturação populacional da Categoria I, enquanto 17 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria III a V e apenas 4 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria II. As 48 espécies listadas por Avise (2000) estão distribuídas em sistemas hidrográficos de vários continentes, principalmente Europa e América do Norte, chamando atenção o fato de que nenhuma espécie de peixe de água doce da região Neotropical (América do Sul e América Central) havia sido analisada filogeograficamente.

Este cenário mudou consideravelmente nos últimos sete anos. Atualmente cerca de 60 espécies de peixes de água doce da região Neotropical apresentam dados disponíveis sobre filogeografia molecular (Alves *et al.*, submetido1). Entre estes se destacam o estudo filogeográfico em populações de *Prochilodus lineatus* nos principais rios da América do Sul,

principalmente na bacia do rio Paraná (Sivasundar *et al.*, 2001). Os resultados deste trabalho sugerem elevado nível de variação nucleotídica entre os haplótipos amostrados na bacia do rio Paraná, sendo possível identificar haplótipos divergentes em simpatria (subpopulações) nos rios da Plata e Uruguai. Os autores ainda sugerem que as amostras de *P. lineatus* do alto rio Paraná (rio Mogi-Guaçu) seriam fortemente relacionadas com os haplótipos encontrados à 2600 km em rios do baixo rio Paraná na Argentina. Perdices *et al.* (2002) apresentam um extenso trabalho no gênero *Rhamdia* na América Central, no qual as inferências filogenéticas mostraram que *R. nicaraguensis* é sinônimo de *R. laticauda* e sugerem dois clados para a América Central, *R. guatemalensis* e *R. laticauda* e não três como sugeria Silfvergrip (1996). Os autores ainda restringem a distribuição de *Rhamdia quelen* apenas para a região cis-Andina da América do Sul, diferindo de Silfvergrip (1996) e Bockmann & Grezzelli (2003). Para testar esta hipótese filogeográfica de *Rhamdia quelen*, Alves *et al.* (2007) analisaram populações desta espécie ao longo das bacias da Plata, Amazônica, Orinoco e Essequibo na América do Sul, e além de confirmar a hipótese de que *Rhamdia quelen* não está presente na América Central e na porção trans-Andina da América do Sul, os autores ainda observaram 11 distintas linhagens mitocondriais na região cis-Andina da América do Sul distintas geneticamente, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies, principalmente nas bacias dos rios costeiros e do Alto rio Paraná.

Embora o número de espécies analisadas sob o enfoque filogeográfico tenha crescido nos últimos anos (Dergan *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Batista & Alves-Gomes, 2006; Willis *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2007; entre outros) ainda é inexpressivo perto dos cerca de 8000 espécies de peixes de água doce descritas para a região Neotropical, de acordo com Reis *et al.* (2003). Nesse sentido, as filogenias baseadas em dados moleculares, têm fornecido acesso mais objetivamente à história evolutiva de espécies/populações de peixes de água doce Neotropicais fortemente relacionadas e contribuem para a determinação da sua distribuição geográfica.

Nos últimos anos as análises filogenéticas em peixes eram predominantemente realizadas apenas com base na análise de genes mitocondriais (Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Zardoya & Doadrio, 1999; Perdices & Doadrio, 2001; Strecker *et al.*, 2004; Templeton, 2004; Alves, 2005; Alves *et al.*, submetido2; Hardman, 2005), que tem se provado ser um importante marcador molecular para estudos evolucionários em populações de animais, devido a sua ancestralidade materna, relativa substituição rápida de bases, falta de recombinação e fácil isolamento (Avice *et al.*, 1987). No entanto, atualmente há uma nova tendência em utilizar genes nucleares e mitocondriais em conjunto tanto em análises de

sistemática molecular como em filogeografia (Calcagnotto *et al.*, 2005; Perdices *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006; Hardman & Lundberg, 2006; Betancur-R *et al.*, 2007; Li & Orti, 2007). De modo geral, parece ser um consenso entre os filogeneticistas que, há a necessidade de construção de várias hipóteses filogenéticas, baseadas em diferentes conjuntos de caracteres, antes de se procurar interpretar a história evolutiva de um táxon ou de uma região. Nesta nova tendência, de utilizar genes nucleares e mitocondriais em conjunto, um dos principais e mais resolutivos genes do genoma nuclear empregado nas análises filogenéticas e filogeográficas são os genes RAG-1 e RAG-2 (Perdices *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2006; Li & Orti, 2007; Betancur-R *et al.*, 2007).

1.3 O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854: Aspectos ecológicos, taxonômicos e genéticos

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, conhecido popularmente como o grupo dos “Lambaris”, é um dos maiores em número de espécies entre os peixes Neotropicais, com cerca de 100 espécies válidas descritas (Lima *et al.*, 2003; Haluch & Abilhoa, 2005; Melo & Buckup, 2006; Bertaco & Garutti, 2007). Ele se encontra na família Characidae que faz parte da ordem Characiformes (Fink & Fink, 1981), representando aproximadamente 55% desta ordem, que engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce, sendo que, na América do Sul, compreende cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros (Britski, 1972). Em uma revisão recente, perto de 90 espécies válidas foram consideradas *insertae sedis* nos Characidae (Reis *et al.*, 2003). A última revisão completa do gênero, feita por Eigenmann há cerca de 70 anos (1912 e 1927), considerava 74 espécies e subespécies e nos anos que se seguiram espécies foram retiradas do gênero e várias outras foram descritas. No trabalho mais recente sobre o gênero, Géry (1977) arranhou as espécies dentro de um esquema que segue fundamentalmente aquele proposto por Eigenmann e reconhece pouco mais de 60 espécies, aparentemente desconsiderando algumas e referindo-se a outras como subespécies.

Sua ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitat em rios e riachos, faz com que este seja um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Embora alto, o número de espécies de *Astyanax* ainda é subestimado, entre os anos de 2003 e 2007 foram descritas 16 novas espécies no gênero, principalmente pertencentes ao complexo *scabripinnis*. De acordo com Garutti (1995) o gênero *Astyanax* tem uma distribuição compartimentalizada, sugerindo

um endemismo notável, existe uma diferente forma para cada bacia e, dentro de cada bacia, existem diversas formas com relativa distribuição geográfica restrita.

A sistemática do gênero é complicada e ainda não está resolvida devido à falta de evidências para corroborar seu *status* monofilético, assim pode tratar-se de diferentes e independentes linhagens evolutivas (Weitzman & Fink, 1983; Zanata, 1995; Weitzman & Malabarba, 1998; Melo & Buckup, 2006; Bertaco & Garutti, 2007).

A definição atual de *Astyanax* é baseada na combinação de caracteres propostos por Eigenmann (1917), única revisão do gênero disponível, no qual muitos destes caracteres são compartilhados com outros gêneros de Characidae (Bertaco e Lucena, 2006).

A complexidade envolvida na genética do gênero *Astyanax* é quase tão grande quanto a sua dispersão. Embora exista um bom número de trabalhos levantando dados citogenéticos sobre o gênero, eles ainda são insuficientes dada a dispersão do mesmo que vai desde do sul dos Estados Unidos, onde foram encontrados exemplos de *A. mexicanus* apresentando $2N=50$ (Kirby, 1977 *apud* Fernandes & Martins-Santos, 2004), até a Argentina, onde foram encontrados exemplos de *A. bimaculatus* apresentando $2N=50$ (Fenochio *et al.* 1994 *apud* Fernandes & Martins-Santos, 2004).

No Brasil o número de trabalhos é grande, principalmente no complexo *A. scabripinis*, no nosso país se encontra espécies de *A. bimaculatus*, apresentando $2N=50$, provenientes da bacia do Traíri no Rio Grande do Norte (Fernandes & Martins-Santos, 2004), até Três Bocas no Paraná onde espécies de *A. fasciatus* apresentam $2N=46$ (Carvalho *et al.*, 1998). Na bacia do Alto Paraná as principais espécies como, *A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. schubarti*, apresentam $2N= 50$, $2N=50$ e $2N=36$ respectivamente. Ainda são encontrados os prováveis complexos de espécies como, *A. fasciatus* que apresentam citótipos que variam de $2N= 46$, em sua maioria, até $2N=48$ em algumas poucas populações. A espécie *A. paranae* única representante do complexo *A. scabripinis* na bacia Paranapanema, também apresenta indícios de ser um pequeno complexo de espécies. Os números diplóides mais frequentes em *Astyanax paranae* são $2n=50$ e $2n=48$ cromossomos, entretanto algumas populações apresentam $2n=46$ (Maistro *et al.*, 1998; Alves & Martins-Santos, 2002; Porto-Foresti *et al.*, 1997).

No ramo da genética molecular alguns trabalhos são encontrados utilizando-se genes mitocondriais e nucleares. Ornelas-García *et al.* (2008) propuseram um modelo de dispersão filogeográfica para o gênero *Astyanax* na América Central e sul da América do Norte, com base no gene mitocondrial Citocromo B (*CitB*) e no gene nuclear *RAG1*. Em outro trabalho na região sul da América do norte e América Central, Strecker *et al.* (2004), propõe um

modelo filogeográfico de dispersão para os *Astyanax* de caverna, utilizando uma parte do Citocromo B (*CitB*) assim como novas propostas taxonômicas para o gênero. Na bacia do Alto Paraná, o trabalho de Moysés & Almeida-Toledo (2002) utilizou a técnica de RFLP para identificar padrões nas espécies de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. lacustris*, *A. scabripinnis paranae* e *A. schubarti*.

Assim como a sistemática do gênero não está resolvida, o status taxonômico de algumas espécies de *Astyanax* não é completamente claro e muitas vezes complexos de espécies são encontrados. No Alto rio Paraná estão presentes 3 complexos:

1) “complexo *Astyanax bimaculatus*” composto aproximadamente por 18 espécies e subespécies que é caracterizado pela presença de mácula umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais escuras situadas na região umeral, e mácula negra no pedúnculo caudal estendida até os raios caudais medianos.

2) “complexo *Astyanax fasciatus*” caracterizado por possuir uma série de escamas da pré-dorsal regular, terceiro da infra-orbital não cobrindo o opérculo, mácula umeral alongada, faixa lateral prateada que se torna negra no pedúnculo caudal se estendendo sobre os raios caudais medianos, origem da nadadeira dorsal igualmente distante do focinho e da nadadeira caudal e um ou mais dentes no osso maxilar, raramente três. Um exemplo dessa complexidade taxonômica é o trabalho realizado por Strecker *et al.* (2004) com populações de espécies de *Astyanax* na América Central e do Norte no qual os resultados sugerem que a divergência genética baixa observada, não é compatível com a taxonomia proposta, e que as espécies encontradas nesta região, mesmo as de cavernas, como *A. mexicanus*, devam constituir uma simples unidade taxonômica, *Astyanax fasciatus*.

3) “complexo *Astyanax scabripinnis*” composto de 15 espécies compartilhando número reduzido de raios ramificados da nadadeira anal, altura do corpo reduzida, cabeça e corpo robustos (Garutti & Britski, 2000; Bertaco & Lucena, 2006; Melo & Buckup, 2006). Eigenmann (1921) ao descrever *Astyanax scabripinnis* reconheceu diferenças morfológicas populacionais e as atribuiu erroneamente como subespécies e não como espécies distintas estritamente relacionadas. Os primeiros autores a reconhecer *Astyanax scabripinnis* como um complexo de espécies foram Moreira-Filho & Bertollo (1991), com base em caracteres morfológicos e cariotípicos que diagnosticaram ao menos seis populações dos rios da bacia do São Francisco e alto rio Paraná. A discussão sobre o complexo *scabripinnis* foi expandida por Bertaco & Malabarba (2001) com a descrição de duas novas espécies relacionadas ao complexo de espécies. Deste então, a atual tendência é de considerar as subespécies de

Astyanax scabripinnis como espécies válidas (Bertaco & Malabarba, 2001; Lima *et al.*, 2003; Bertaco & Lucena, 2006).

Embora as subespécies de *Astyanax scabripinnis* sejam reconhecidas como espécies válidas, um profundo estudo taxonômico e sistemático neste complexo ainda é necessário, para assim, se estabelecerem às relações filogenéticas entre as espécies válidas e identificar novas espécies pertencentes ao complexo *scabripinnis*.

A espécie *Astyanax paranae*, portanto, de acordo com a nova tendência taxonômica é a única espécie do complexo *scabripinnis* presente na bacia do Paranapanema. Uma das principais características de *Astyanax paranae* é seu hábito restrito as nascentes de riachos (Caramaschi, 1986), diferente das demais espécies do gênero encontradas nesta bacia hidrográfica. Esta característica ecológica define um drástico isolamento populacional que certamente reflete na estrutura populacional desta espécie ao longo da bacia do alto rio Paraná. Este fato sugere a necessidade de um amplo estudo filogeográfico em *Astyanax paranae* e o torna um excelente modelo para estudos de estrutura de populações e história evolutiva em peixes de riachos Neotropicais.

1.4 Justificativa

A ausência de dados moleculares populacionais robustos e as evidências morfológicas de que *A. paranae* não deva constituir uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, justificam a presente proposta e reforçam a necessidade de um amplo estudo filogeográfico e filogenético.



Fig1. Exemplar de *Astyanax paranae* retirada de Castro et al. (2003).



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Para o desenvolvimento do trabalho, foi considerada a seguinte hipótese e objetivos específicos:

Hipótese a ser testada: “Na bacia do rio Paranapanema as populações de *Astyanax paranae*, isoladas geograficamente apresentam baixo fluxo gênico, possibilitando a identificação de linhagens mitocondriais exclusivas para os principais rios que compõem esta bacia hidrográfica”.

Objetivos específicos:

- Estabelecer as relações filogenéticas entre as populações de *Astyanax paranae*, buscando identificar clados altamente divergentes que possam ser representantes de outras espécies do gênero.
- Propor modelos biogeográficos de dispersão e colonização populacional para a ictiofauna de riachos na bacia do rio Paranapanema.



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O trabalho foi desenvolvido sobre o enfoque da filogeografia e sistemática molecular de populações de *Astyanax paranae* na bacia do Paranapanema, buscando identificar a estrutura genética das populações, o modo de distribuição das linhagens ao longo desta bacia e as relações filogenéticas entre as linhagens do DNAm.

Para as análises filogenéticas foram utilizadas seqüências do gene mitocondrial Citocromo B (cyt *b*).

Inicialmente foram analisadas 8 populações de *Astyanax paranae*: 2 populações da bacia do rio Pardo, 1 do Córrego Hortelã, 2 do Véu de Noiva, Botucatu/SP; 4 populações da bacia do rio Tibagi, 1 população Maria da Serra/PR; 1 de Ponta Grossa/PR, 1 de Cambé/PR, 1 de Castrolanda/PR e 1 população do rio Itapetiniga, rio Itapetininga, Itapetiniga/SP, tendo o número de indivíduos por população variado de 1 a 5.

Como grupo externo foram analisados 1 população de *Astyanax altiparanae* com 3 indivíduos (Véu de Noiva pt2, Botucatu/SP); 1 população de *Astyanax fasciatus* com 5 indivíduos (região de Itapetiniga/SP) e 1 população de *Astyanax bockmanni* com 2 indivíduos (Véu de Noiva pt2, Botucatu/SP); em um total de 39 indivíduos.

Entre as 8 populações analisadas se inclui a população da localidade tipo na bacia do rio Tibagi (Castrolanda/PR).

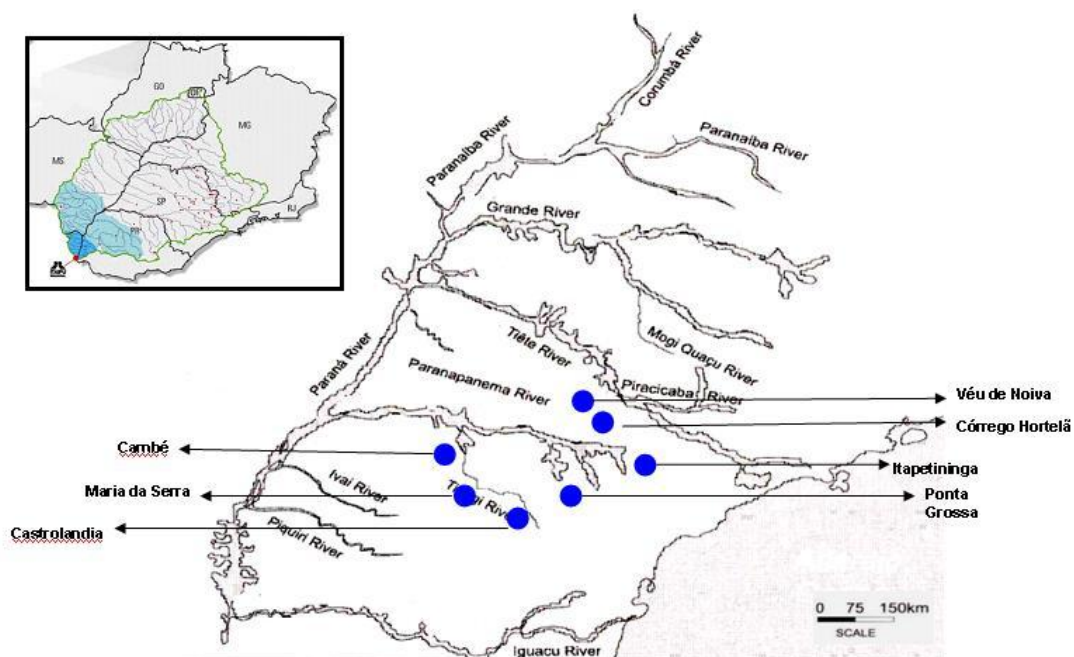


Fig. 2: Mapa da bacia do Alto Rio Paraná evidenciando os pontos de coleta.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir de amostras de músculo e/ou fígado utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (Sambrook, 2001):

1. Preparar uma solução de lise contendo:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
TNE 1X	300µL
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	30µL
SDS 10%	20µL
Proteinase K (20mg/mL)	25µL
Volume final	3345µL

2. Colocar as amostras de tecidos em um tubo eppendorf juntamente com a solução de lise recém preparada e dar um vórtex de 15 segundos em cada tubo;

3. Deixar os tubos em estufa a 37°C *overnight* e, em seguida, adicionar 8µL de RNase 10mg/mL;
4. Deixar os tubos com RNase em estufa a 37°C por 1 hora, agitando o tubo a cada 30 minutos;
5. Levar os tubos com os tecidos completamente digeridos para a capela e adicionar 400µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1);
6. Dar um vórtex de 30 segundos e, em seguida, centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos;
7. Retirar os tubos da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e transferir o sobrenadante (fase aquosa contendo DNA) para um novo tubo correspondente;
8. Adicionar a cada tubo 60µL acetato de sódio 3M (pH 5,3) e inverter o tubo lentamente para a completa mistura do sal com a solução;
9. Adicionar a cada tubo 600µL de etanol absoluto gelado e inverter o tubo como no passo anterior (se houver formação de nuvens, transferir para um novo tubo contendo 1000µL de etanol absoluto);
10. Deixar os tubos no freezer por 30 minutos;
11. Centrifugar os tubos a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa retirada da mistura etanol + acetato de sódio;
12. Adicionar 150µL de etanol 70% a temperatura ambiente e centrifugar novamente a 14.000 rpm por 30 minutos;
13. Descartar o sobrenadante, certificando-se que o precipitado de DNA continua aderido à parede do tubo;
14. Repetir os passos 12 e 13 (exceto nos tubos onde ocorreu a formação de nuvens);
15. Secar o DNA em estufa a 37°C por 30 minutos, colocando os tubos abertos sobre folhas de papel absorventes;
16. Ressuspender o DNA com 100µL (sem nuvens) ou com 250µL (com nuvens) de água Milli Q autoclavada, agitando o tubo delicadamente para soltar o DNA que está aderido à parede;
17. Levar o material para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferir os tubos para a geladeira (4°C) e manter *overnight* para a completa ressuspensão;
18. Armazenar em freezer (-20°C) para conservar por longo prazo.

3.2.2. Amplificação do DNA

O gene mitocondrial Citocromo B (cyt *b*), foi amplificado completamente (1140pb) utilizando o seguinte conjunto de primers:

L-GluDG-CitF 5' - TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3'
 H-16460-CitR 5' - CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G – 3'

A reação de amplificação por PCR do gene Citocromo B (cyt *b*) foi preparada em um tubo de 0.5 mL, com os reagentes e volumes descritos a seguir:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
Mix PCR * (Qiagen)	6,25µL
Água Milli Q	5,25µL
Primer F 10µM	0,5µL
Primer R 10µM	0,5µL
DNA	1,0µL
Volume final	13,5µL

* Na solução de MIX PCR estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, Tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1,5mM e dDNTTP (dideoxinucleotídeo trifosfato) 200µM.

Para o gene mitocondrial CytB, o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 90 segundos, estendendo a cadeia e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

A reação de PCR foi realizada em termociclador EPPENDORF®, modelo MasterCycler EP Gradient. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,0%, corados com 2µL SYBER Safe (10,000X) (Invitrogen®), em 1µL tampão de corrida *blue juice* (10X) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. A quantificação do produto gênico amplificado foi realizada utilizando o marcador de peso molecular Lambda (λ) DNA 50ng e 30ng, verificados em gel de agarose 1% (Figura 3)

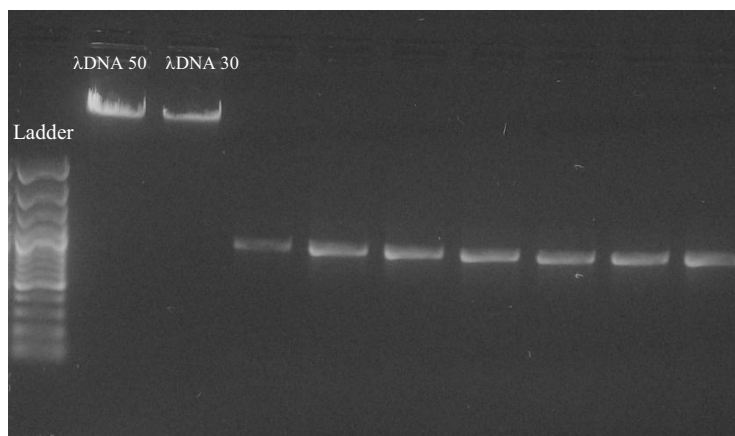


Figura 3.: Exemplo de quantificação do produto gênico (*Cyt b*) amplificado por gel de agarose.

3.2.3. Limpeza do produto de PCR para Sequenciamento

Para a realização do PCR de sequenciamento do gene Citocromo B (*cyt b*), padronizou-se as amostras em 50ng de DNA/ μ L, nesse sentido, apenas as amostras amplificadas por PCR que obtiveram este valor na quantificação seguiram para a próxima etapa de purificação através do tratamento com a enzima EXOSAP (GE Healthcare), de acordo com o protocolo abaixo:

1. Limpar 10 μ L do produto de PCR, adicionando 2 μ L de Exosap e 2 μ L de água Milli Q autoclavada;
2. Levar os tubos recém preparados ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37°C e 15 minutos a 80°C;
3. Retirar os tubos do termociclador e fazer 2 novos tubos, aliquotando em um tubo 5 μ L do produto já limpo com 2,5 μ L de *primer forward* (F) e em outro tubo *primer reverse* (R), seguindo os mesmos volumes do tubo um.

O DNA purificado foi enviado para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, onde foi realizada a reação de PCR de sequenciamento, a limpeza deste PCR e o sequenciamento em sequenciador automático de DNA modelo MEGABACE 1000 (GE HealthCare™) com o kit DYEnamic ET terminator reagent premix para MEGABACE (Amersham Biociences), através de terceirização de serviços pela Universidade de São Paulo (USP).

3.2.4. Análise das sequências

Os programas Multalin, *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*, (Corpet, 1988) e DAMBE, *Data analysis in molecular biology and evolution* (Xia e Xie, 2001), foram utilizados para realizar o alinhamento das sequências. Além disso, utilizou-se o programa DAMBE para verificar a saturação dos dados, através da elaboração do gráfico de transição/transversão.

As análises filogenéticas foram conduzidas através do uso do programa MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura et al., 2007), no qual foram determinadas a composição nucleotídica das sequências, a distância genética e a elaboração das árvores filogenéticas pelos métodos de *Neighbor-Joining* (NJ), *Minimum Evolution* (ME) e *Maximum Parsimony* (MP). O teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), foi utilizado para dar suporte aos clados obtidos pelas análises filogenéticas através dos métodos de NJ, ME e MP. Foram empregados 1000 réplicas de *bootstrap* para cada análise. O relógio molecular foi calculado assumindo a taxa de evolução do gene em 0,8 % de divergência por milhão de ano para o gene Citocromo B (cytB) em *Astyanax* (Ornelas-Garcia, 2008) e 1,09%/Ma para peixes (Bermingham et al., 1997).

As análises filogeográficas previstas no plano inicial do projeto não foram realizadas devido a dificuldades taxonômicas, como mencionado a seguir nos Resultados e Discussão.



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Composição nucleotídica das seqüências do gene Citocromo B.

O alinhamento das seqüências das populações de *A. paranae* e de suas espécies irmãs *A. altiparanae*, *A. fasciatus* e *A. bockmanni* indicou um total de 1136 pares de base para o gene Citocromo B, sendo 809 pares de base conservados, 328 pares de base variáveis, 238 pares de base filogeneticamente informativos para análises de Máxima Parcimônia e 90 pares de base Singleton. Os nucleotídeos presentes nas seqüências de *Astyanax* apresentaram a seguinte composição média de bases: 30,5 (T), 29,0 (C), 26,6 (A) e 13,9 (G) (Tabela 1) e média de 378 códons utilizados. Essa composição nucleotídica comprova que o gene sequenciado é, de fato, um gene mitocondrial, já que, em vertebrados, a quantidade média da base “G” é superior as demais bases nitrogenadas.

Tabela 1.: Frequência da composição nucleotídica do gene Citocromo B para as espécies do gênero *Astyanax*

	T(U)	C	A	G	Total
amexicanus1	31.1	28.4	27.1	13.4	1135
AP1-41-438	30.3	29.1	26.8	13.7	1136
AP2-42-439	30.2	29.4	26.6	13.8	1136
AP3-43-440	30.2	29.4	26.6	13.8	1136
AP4-44-441	30.3	29.1	26.8	13.7	1136
AP5-45-472	30.1	29.6	26.3	14.0	1136
AP6-46-473	30.3	29.5	26.1	14.1	1136
AP7-47-474	30.5	29.0	26.6	14.0	1136
AP8-48-475	30.0	29.7	26.2	14.1	1136
AP9-49-476	30.1	29.6	26.2	14.1	1136
AP10-50-529	31.5	27.6	27.1	13.7	1136
AP11-51-530	31.7	27.6	26.9	13.7	1136
AP12-52-531	31.8	27.6	27.0	13.6	1136
AP13-53-532	31.7	27.3	27.2	13.8	1136
AP15-55-534	29.7	29.8	26.8	13.7	1136
AP16-56-535	29.7	29.8	26.8	13.7	1136
AP17-57-536	29.7	29.8	26.8	13.7	1136
AP18-58-544	29.8	29.8	27.2	13.3	1136
AP19-59-545	31.8	27.7	26.9	13.6	1136
AP20-60-546	30.0	29.6	26.7	13.7	1136
AP21-61-547	30.3	29.2	26.8	13.7	1136
AP22-62-548	30.0	29.6	26.7	13.7	1136
AP23-63-549	30.1	29.4	26.7	13.8	1136
AP24-64-550	30.2	29.4	26.2	14.2	1136
AP25-65-551	30.7	28.6	26.4	14.3	1136
AP26-66-552	30.6	28.9	26.2	14.3	1136

AP27-67-553	30.1	29.5	25.9	14.5	1136
AP28-68-554	30.1	29.5	26.1	14.3	1136
AP29-69-557	30.1	29.3	26.2	14.3	1136
AP30-70-558	30.1	29.4	26.1	14.3	1136
AP31-71-559	30.0	29.4	26.3	14.3	1136
AP32-72-751	30.2	29.2	26.6	14.0	1136
AP33-73-752	30.2	29.2	26.6	14.0	1136
AP34-74-838	31.8	27.7	26.8	13.6	1136
AP35-75-839	31.7	27.7	26.9	13.6	1136
AP36-76-840	31.8	27.6	26.8	13.7	1136
AP37-77-841	30.1	29.4	26.6	13.9	1136
AP38-78-842	29.8	29.6	26.8	13.8	1136
AP39-79-843	30.2	29.4	26.6	13.8	1136
AP40-80-844	30.1	29.4	26.8	13.7	1136
Avg.	30.5	29.0	26.6	13.9	1136.0

A obtenção das sequências consenso foi dada a partir da visualização simultânea entre as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) e seus respectivos eletroferogramas (Figura 4).

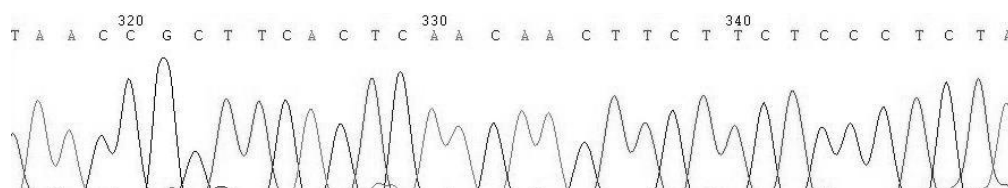


Figura 4.: Exemplo de Eletroferograma, evidenciando os picos de leitura

O alinhamento inicial gerado pelo programa DAMBE foi testado manualmente e as posições foram corrigidas quando necessário.

A observação das seqüências no programa Multalin mostrou que o alinhamento e, conseqüentemente, o seqüenciamento estavam confiáveis, uma vez que houve uma grande quantidade de seqüências que possuíam um valor de consenso alto (90%), evidenciado pelas bases em vermelho.

4.2. Análises filogenéticas das populações de *Astyanax paranae*

A análise de saturação dos nucleotídeos foi avaliada pelo programa DAMBE versão 4.5.8 (Xia e Xie, 2001), plotando-se as transições (S) e transversões (V) contra a divergência genética estimada pelo modelo de evolução de sequências “Felsenstein 84” (Figura 6). Demonstrando que não existe saturação de dados.

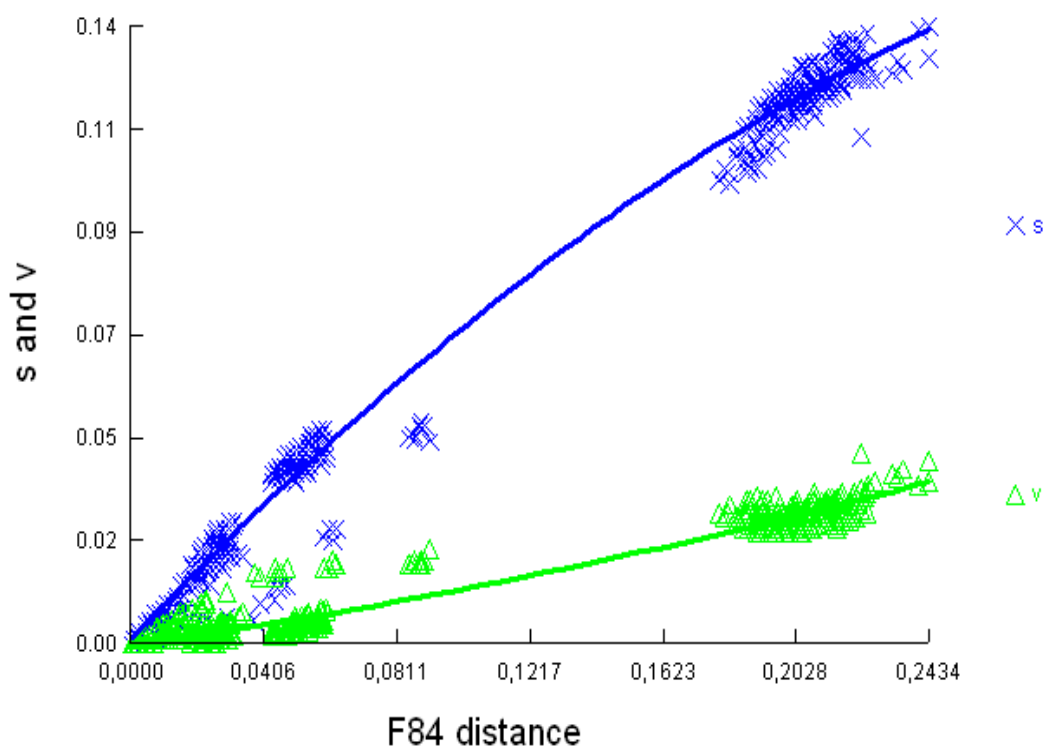


Figura 6.: Gráfico de transição (linha “s”) / transversão (linha “v”). Observa-se que não ocorreu saturação dos dados.

Após a avaliação desses dados preliminares, deu-se segmento as análises filogenéticas, que foram conduzidas no programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) pelos métodos de “Neighbor Joining (NJ)” (Figura 7), “Minimum Evolution (ME)” (Figura 8) e “Máxima Parcimônia (MP)” (Figura 9), com 1000 re-amostragens pelo método de *Bootstrap* usando o modelo evolutivo Nucleotide: Maximum Composite Likelihood. As árvores consenso foram geradas cortando-se os valores de *bootstraps* menores do que 50%.

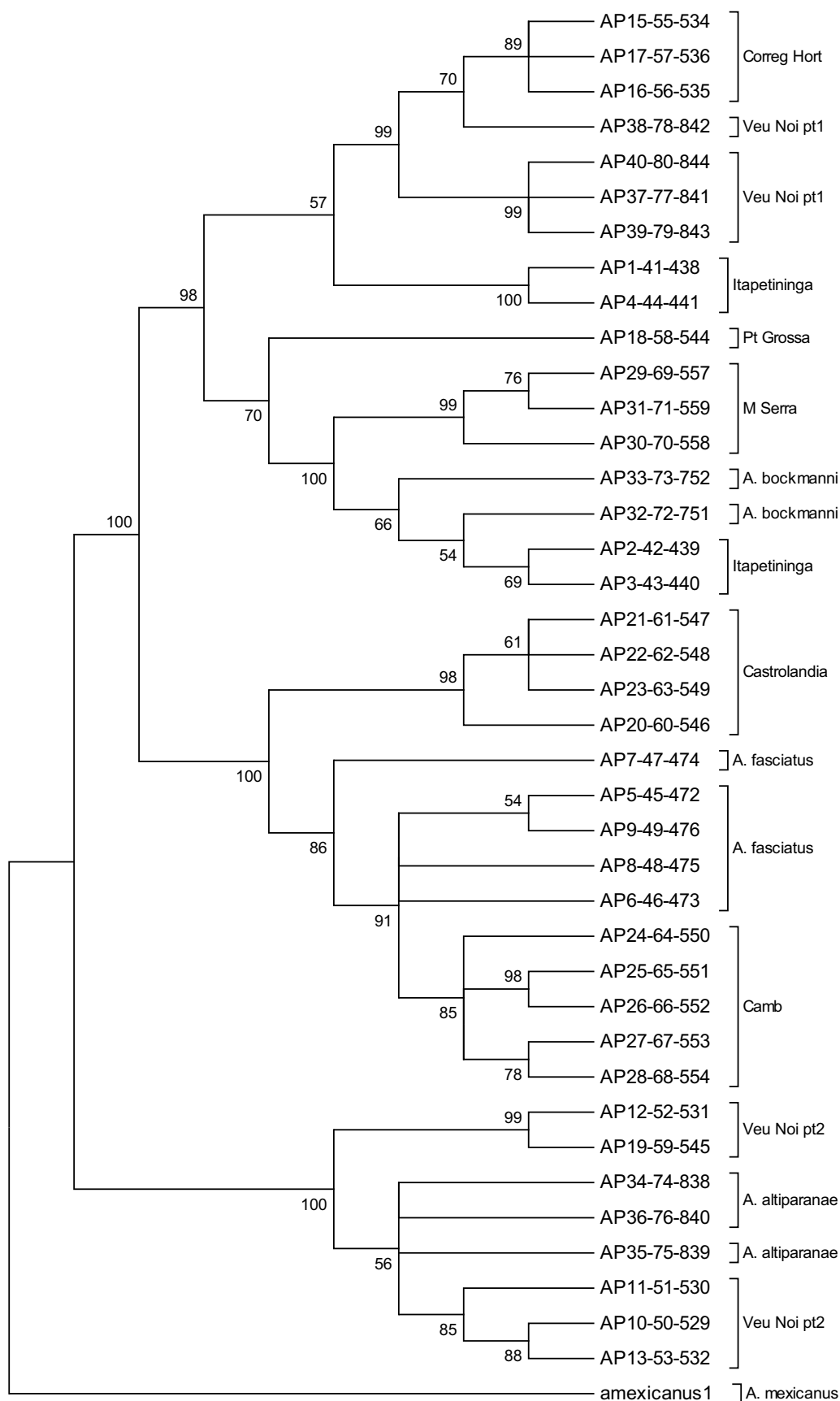


Figura 7.: Árvore consenso a partir da análise de *Neighbor-Joining* para as espécies de *Astyanax* com base na sequência completa do gene mitocondrial *CytB*. Os valores dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), que servem de suporte para os clados.

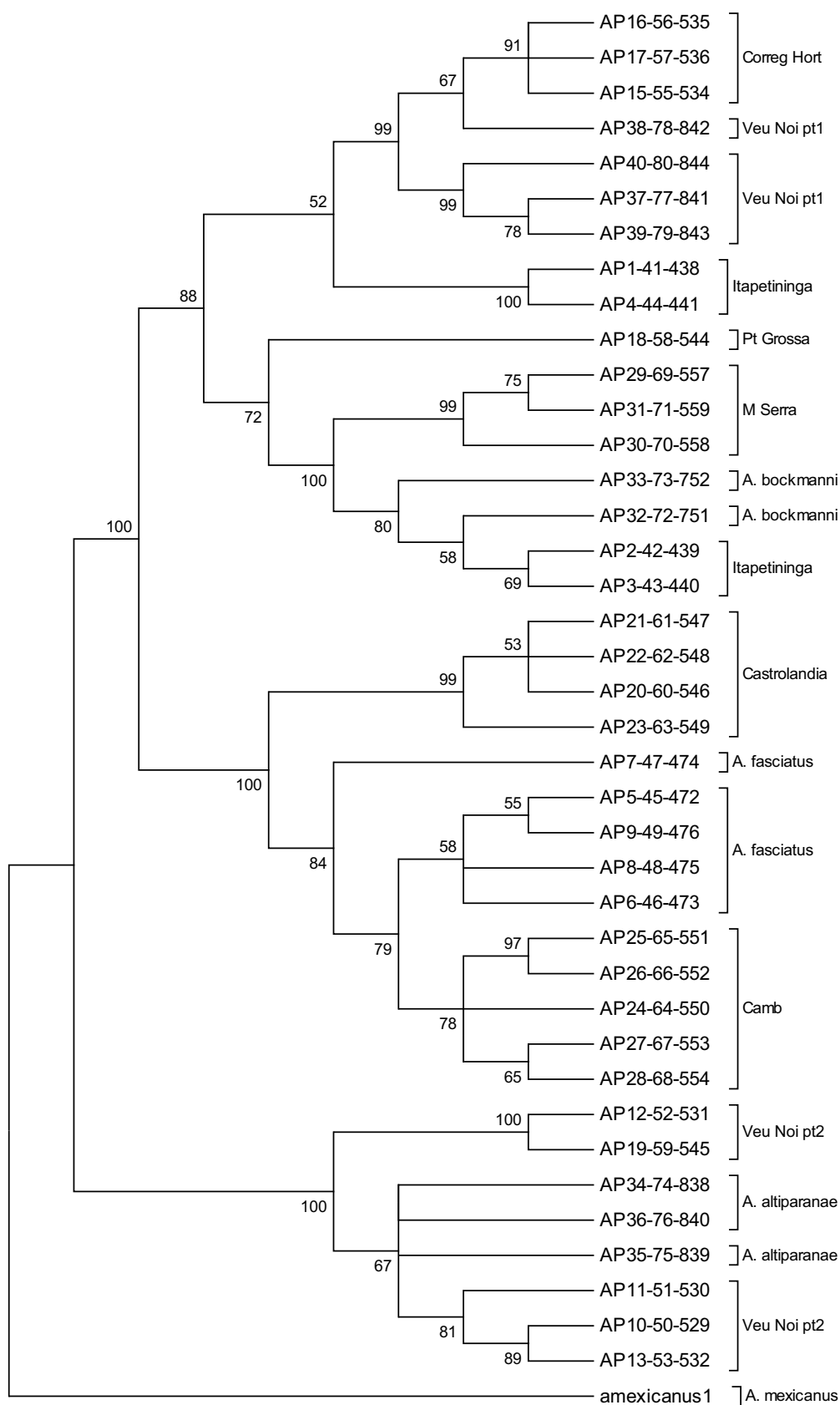


Figura 8.: Árvore consenso a partir da análise de *Minimum Evolution* para as populações de *Astyanax paranae* e espécies relacionadas de *Astyanax* com base na sequência completa do gene mitocondrial *CitB*. Os valores dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), que servem de suporte para os clados.

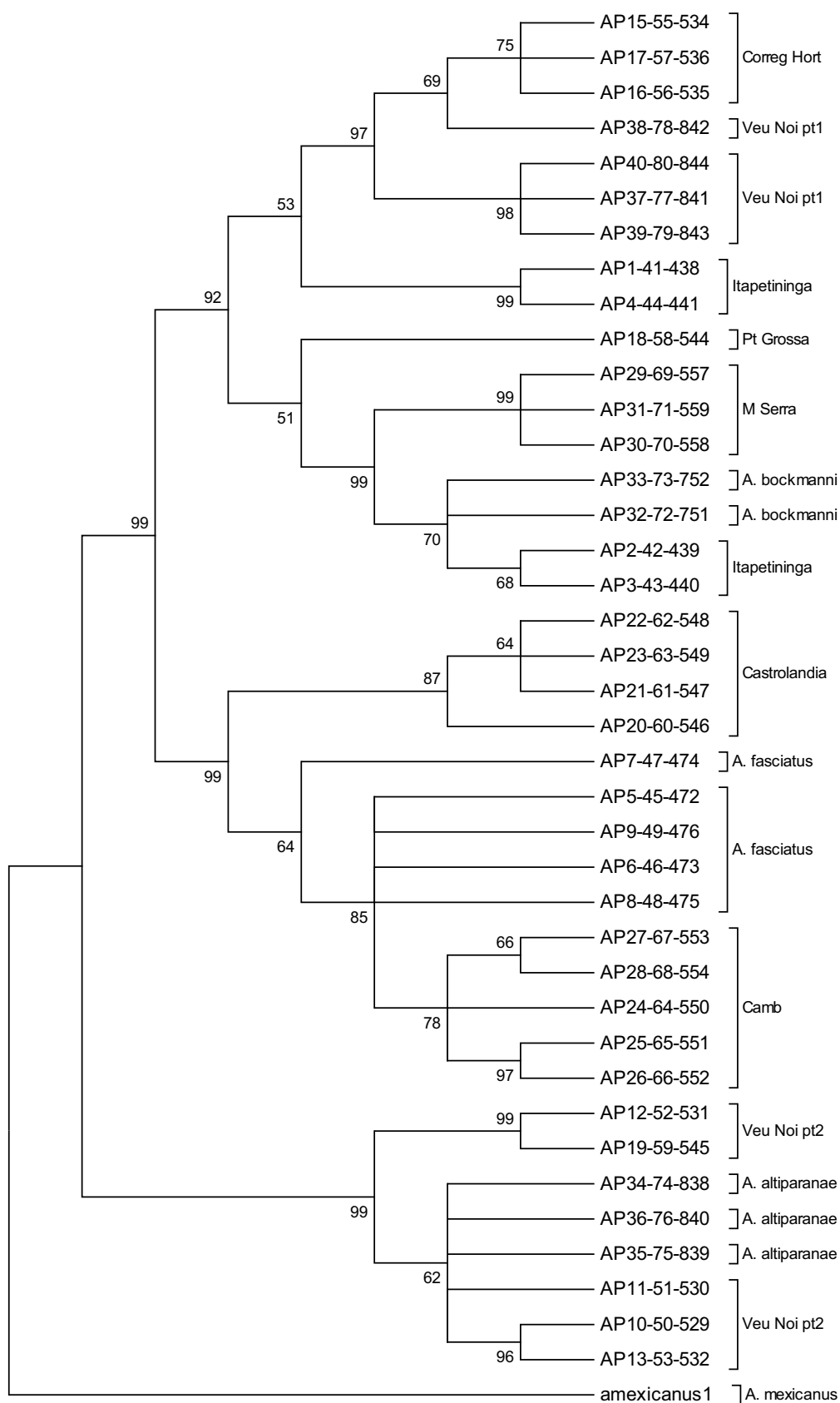


Figura 9.: Árvore consenso a partir da análise de Máxima Parsimônia para as populações de *Astyanax paranae* e espécies relacionadas de *Astyanax* com base na sequência completa do gene mitocondrial *CitB*. Os valores dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), que servem de suporte para os clados

4.3. Distância genética entre as populações de *Astyanax paranae* e espécies relacionadas

O cálculo das distâncias genéticas foram conduzidas pelo programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), utilizando o modelo de evolução nucleotídica Kimura 2-parameter. Os resultados obtidos para a diversidade genética dentro das populações variou de 0,0 (Córrego Hortelã) até 0,017 (Véu de Noiva).

Tabela 2.: Valores das distâncias genéticas dentro dos grupos. d =distância genética.

	d
A. Mexicanus	n/c
Itapetininga	0,016
Fasciatus	0,008
Veu Noi pt 2	0,017
Correg Hort	0,000
Pt Grossa	n/c
Castrolandia	0,007
Camb	0,015
M. Serra	0,002
A. bockmanni	0,004
A. altiparanae	0,007
Veu Noi pt 1	0,004

Entre as populações as diversidade genética variou de 0,006 entre as populações do Córrego Hortelã e Véu Noiva PT-1 e de 0,189 entre as populações de Cambe e Véu de Noiva PT-2).

Tabela 3 .: Valores das distâncias genéticas entre os grupos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Mex											
2 Itapetininga	0,157										
3 A fasciatus	0,158	0,046									
4 Veu Noi pt 2	0,168	0,173	0,184								
5 Correg Hort	0,149	0,02	0,045	0,171							
6 Pt Grossa	0,152	0,021	0,048	0,177	0,019						
7 Castrolandia	0,154	0,046	0,019	0,183	0,046	0,044					
8 Camb	0,165	0,053	0,015	0,189	0,052	0,055	0,027				
9 M. Serra	0,162	0,019	0,048	0,18	0,024	0,022	0,048	0,055			
10 A. bockmanni	0,159	0,014	0,045	0,177	0,022	0,019	0,046	0,052	0,009		
11 A. altiparanae	0,167	0,165	0,173	0,015	0,163	0,168	0,171	0,178	0,172	0,168	
12 veu Noi pt 1	0,154	0,022	0,044	0,177	0,006	0,02	0,046	0,052	0,026	0,023	0,168

4.4. Relógio molecular

Com base na análise da diversidade genética entre as populações de *Astyanax paranae* e entre as espécies relacionadas, foi possível estimar o tempo de divergência entre os clados utilizando as taxas de evolução do gene *CitB* conhecidas para o gênero *Astyanax* (0,8%) (Ornelas-Garcia, 2008) e para peixes (1,09%) (Bermingham et al., 1997). Os valores dos cálculos estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6.

Uma árvore filogenética de consenso para os três métodos incluindo os valores de divergência genética e tempo de separação estimado dos clados está apresentada na figura 10.

Tabela 4 .: Valores do tempo de divergência entre os grupos em Milhões de anos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Mex											
2 Itapetininga	14,4-----19,6										
3 A fasciatus	14,5-----19,75	4,2---5,75									
4 Veu Noi pt 2	15,4-----21	15,8---21,6	16,8---23								
5 Correg Hort	13,6-----18,6	1,8---2,5	4,1---5,6	15,6---21,3							
6 Pt Grossa	13,9-----19	1,9---2,6	4,4-----6	16,2---22,1	1,7---2,3						
7 Castrolandia	14,1-----19,25	4,2---5,75	1,7---2,3	16,7---22,8	4,2---5,75	4,03---5,5					
8 Camb	15,1-----20,6	4,8---6,6	1,3---1,8	17,3---23,6	4,7---6,5	5,04---6,8	2,4---3,3				
9 M. Serra	14,8---20,25	1,7---2,3	4,4-----6	16,5---22,5	2,2-----3	2,01---2,75	4,4---6	5,04---6,8			
10 A. bockmanni	14,5---19,8	12,8---17,5	4,1---5,6	16,2---22,1	2,01---2,75	1,7---2,3	4,2---5,75	4,7---6,5	0,825---1,1		
11 A. altiparanae	15,3---20,8	15,1---20,6	15,8---21,6	1,3---1,8	14,9---20,3	15,4---21	15,6---21,3	16,3---22,2	15,7---21,5	15,4---21	
12 veu Noi pt 1	14,1---19,25	2,01---2,75	4,03---5,5	16,2---22,1	0,55---0,75	1,8---2,5	4,2---5,75	4,7---6,5	2,3---3,25	2,1---2,8	15,4---21

Tabela 5 .: Valores do tempo de divergência entre os clados (*A. bockmanni* incluso no clado *A. paranae*) em Milhões de anos.

	1	2	3	4
<u>A mex</u>				
<u>A paranae</u>	14,3–19,5			
<u>A fasciatus</u>	14,5–19,8	4,4–6		
<u>A altip</u>	15,4–21	15,7–21,5	16,6–22,6	

Tabela 6 .: Valores do tempo de divergência entre os clados em Milhões de anos, em detalhe o tempo de divergência entre o clado *A. paranae* e o novo clado *A. bockmanni*.

	1	2	3	4	5
<u>A mex</u>					
<u>A paranae</u>	14–19,1				
<u>A bockmanni</u>	14,5–19,8	2,2–3			
<u>A fasciatus</u>	14,5–19,8	4,4–6	4,5–6,1		
<u>A altip</u>	15,4–21	15,5–21,2	16–21,8	16,6–22,6	

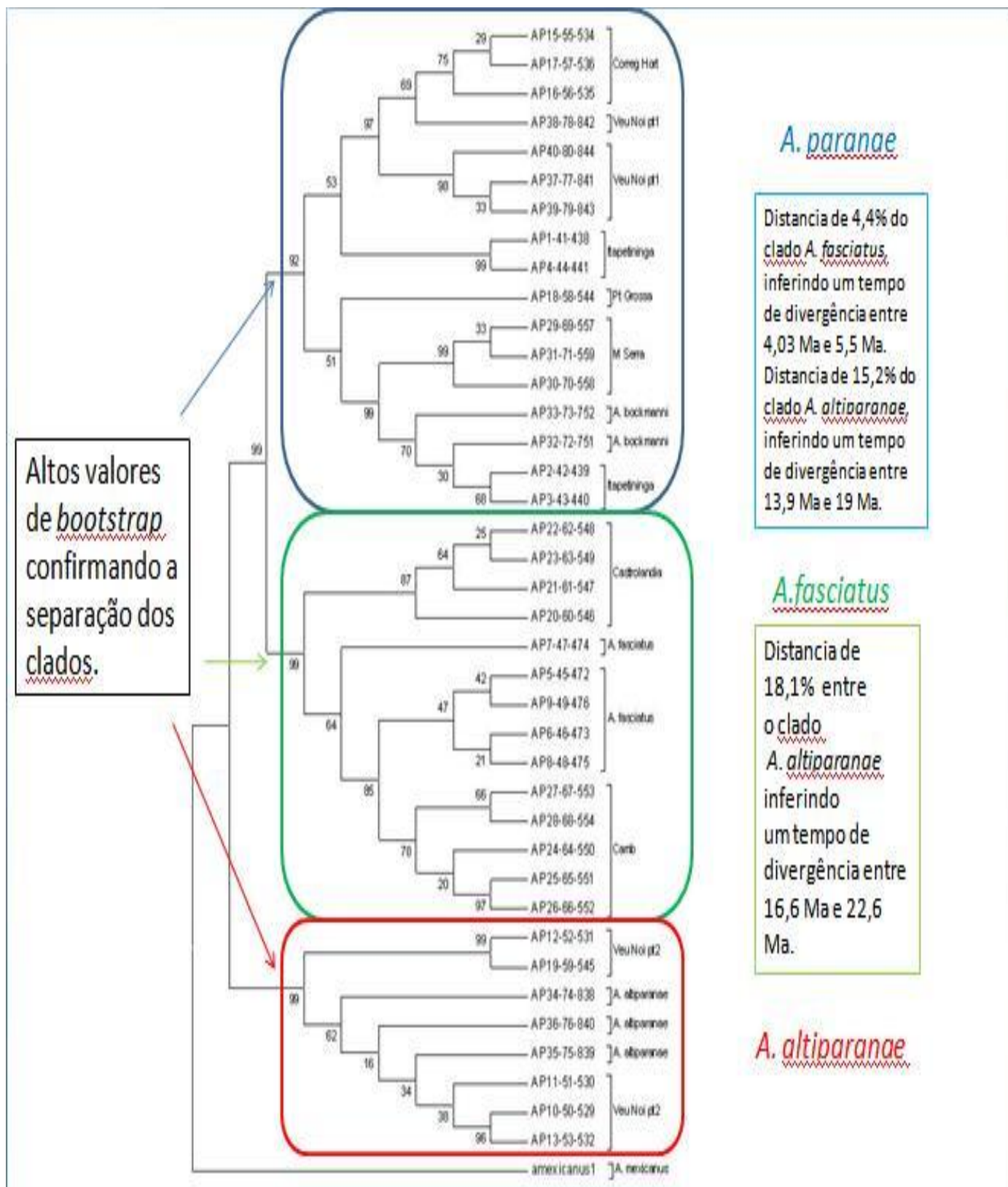


Figura 10.: Árvore consenso a partir das análises de *Neighbor-Joining*, *Minimum Evolution*, Máxima Parsimônia para as espécies *Astyanax* com base na sequência completa do gene mitocondrial *CytB*. Os valores dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), que servem de suporte para os clados e as distancias servem de base para o calculo do tempo de divergência entre as espécies.



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Como já dito anteriormente a sistemática do gênero *Astyanax* é complicada e ainda não está resolvida devido à falta de evidências para corroborar seu *status* monofilético, assim é grande a dificuldade de identificação das espécies que em vários casos se apresentam como prováveis complexos de espécies. (Weitzman & Fink, 1983; Zanata, 1995; Weitzman & Malabarba, 1998; Melo & Buckup, 2006; Bertaco & Garutti, 2007). Inicialmente nesse trabalho julgava-se que as 8 populações amostradas da bacia do rio Paranapanema fossem de *Astyanax paranae* (Córrego Hortelã, Veu de Noiva PT-1 e PT-2, provenientes do Rio Pardo, da região de Botucatu/SP. Uma população do Rio Tibagi região de Maria da Serra/PR. Uma população da região de Ponta Grossa/PR. Uma população da região de Itapetiniga/SP. Uma população do Rio Tibagi, região de Cambé/PR. Uma população do Rio Tibagi, região de Castrolândia/PR) com numero de indivíduos por população variando de 1 a 5. Além de 01 população de *Astyanax altiparanae* com 3 indivíduos (Veu de Noiva pt2, Botucatu/SP); 01 populações de *Astyanax fasciatus* com 5 indivíduos (região de Itapetiniga/SP) e uma e 01 população de *Astyanax bockmanni* com 2 indivíduos (Veu de Noiva PT-2, Botucatu/SP) utilizadas como grupos irmãos.

Após as análises filogenéticas observou-se a inclusão de diversos grupos que julgava-se serem *A. paranae* nos clados de *A. altiparanae* e principalmente de *A. fasciatus*, já as espécies de *A. bockmanni* se agruparam dentro do clado dos *A. paranae*. Esses resultados são embasados por um alto *bootstrap* nas raízes das arvores (Fig. 10) e pela alta divergência entre os grupos (Fig. 10).

A posição de várias populações de *A. paranae* impossibilitou a conclusão das análises filogeográficas nesta etapa do trabalho já que a grande dificuldade de determinar os limites entre as espécies restringiu as análises a nível populacional. No entanto, estamos incluindo novas populações de *Astyanax paranae* e de espécies relacionadas, especialmente de *A. bockmani* para determinar o limite entre as duas espécies. Nesse contexto, realizaremos as análises populacionais envolvendo identificação de haplótipos e relação filogeográfica entre as populações.

Deste modo, discutiremos os resultados obtidos nas análises filogenéticas, onde observou-se a formação de 3 clados bem estruturados (*A. altiparanae*, *A. fasciatus* e *A. paranae*) suportados por altos valores de *bootstrap* (99, 99 e 92 respectivamente) e alta divergência entre os clados (18,1% entre *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, 15,2% entre a

primeira espécie e *A. paranae*; já entre *A. fasciatus* e *A. paranae* a divergência foi de 4,4%) (Fig. 10).

5.1 Clado *Astyanax altiparanae*

O clado *A. altiparanae* é composto por 8 indivíduos de dois pontos (Véu de Noiva PT-2 e Véu de Noiva PT-1, Botucatu/SP) sendo 5 do primeiro ponto e 3 do segundo. A distância genética dentro do clado foi de 1,5%. O tempo de divergência desse clado para o dos *A. fasciatus* está entre 16,6 e 22,6 Milhões de anos; e a distância genética é igual a 18,1% . Já entre o clado dos *A. paranae* o tempo de divergência está entre 13,9 e 19 Milhões de anos; e a distancia genética é igual a 17,2%.

5.2 Clado *Astyanax fasciatus*

O clado dos *A. fasciatus* é composto por 14 indivíduos de 3 diferentes pontos (Uma população da região de Itapetiniga/SP. Uma população do Rio Tibagi, região de Cambé/PR. Uma população do Rio Tibagi, região de Castrolandia/PR) tendo 5 indivíduos nos dois primeiros pontos e 4 no terceiro. A distância genética dentro do clado foi de 1,7%. O tempo de divergência desse clado para o dos *A. paranae* esta entre 4 e 5,5 Milhões de anos; e a distancia genética é igual a 4,8%.

5.3 Clado *Astyanax paranae*

O clado dos *A. paranae* é composto 17 indivíduos de 6 diferentes localidades (Córrego Hortelã, Véu de Noiva pt1, provenientes do Rio Pardo, da região de Botucatu/SP. Uma população do Rio Tibagi região de Maria da Serra/PR. Uma população da região de Ponta Grossa/PR. Uma população da região de Itapetiniga/SP) sendo 3 indivíduos da primeira região, 4 da segunda, 3 da terceira, 1 da quarta e 4 da quinta. A população, composta por 2 indivíduos, de *A. bockmanni* é proveniente do Véu de Noiva pt1, região de Botucatu/SP, foi colocada dentro do clado dos *A. paranae* a baixa divergência observada dentro do clado (1,7% igual ao clado dos *A. fasciatus*) embasa esse arranjo e evidencia a identificação errônea dos indivíduos de *A. bockmanni* e não dos indivíduos dos grupos de *A. paranae* relacionados a primeira espécie.

5.4 Clado *Astyanax bockmanni*

A formação desse novo clado dividiria o dos *A. paranae* praticamente na metade. Esse novo clado seria composto por 8 indivíduos de 4 diferentes localidades (no rio Tibagi, dois pontos, um na região de Ponta Grossa e outra na região de Maria da Serra. Um terceiro ponto na região de Itapetininga e o ultimo proveniente do Véu de Noiva pt1, região de Botucatu/SP) sendo que o primeiro ponto tem 1 indivíduo, o segundo 3, o terceiro e o ultimo 2 indivíduos.

Observou-se uma divergência genética dentro dos dois novos clados (*A. paranae* e *A. bockmanni*) igual a 0,9% para os dois e de 2,4 % entre eles. Calculando o relógio molecular, estima-se que esses dois clados tenham divergido entre 2,2 e 3 milhões de anos. Mas esses resultados não encontram um alto suporte nos valores de *bootstrap* nas raízes dos novos clados (51 para *A. bockmanni* e 53 para *A. paranae*) (Fig.10), sendo a hipótese de um grande clado composto apenas por *A. paranae* mais provável.



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A formação desses 3 clados bem estruturados é uma ótima evidencia de como a genética molecular pode ajudar a solucionar problemas de sistemática e taxonomia em grupos cuja a historia evolutiva ainda não está clara e sua identificação através da morfologia é difícil pela similaridade fenotípica das espécies. Novas análises já estão em andamento para verificar a real posição dos *A. bockmanni* e possibilitar as análises de filogeografia e estruturamento populacional de *A. paranae*.

No entanto com base nas análises realizadas neste trabalho, temos as seguintes conclusões:

1: Observou-se a formação de três clados (*A. altiparanae*, *A. paranae* e *A. fasciatus*) bem estruturados, suportados por altos valores de *bootstrap* e alta distância genética entre eles, evidenciando identificações errôneas de vários indivíduos.

2: A única população de *A. bockmanni* se agrupou no clado dos *A. paranae*, conclusão esta suportada pela distância relativamente baixa dentro do clado *A. paranae* e pelos baixos valores de *bootstrap* nas raízes dos ramos que seriam de *A. bockmanni* e *A. paranae*.

3: Foi demonstrado a eficácia da sistemática molecular como ferramenta na identificação de espécies fenotipicamente próximas, ajudando na identificação de indivíduos considerados incertos .



Laboratório de Genética de Peixes
UNESP – Rio Claro

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A.N. Relevo, estrutura e rede hidrográfica do Brasil. **Bol. Geográfico** 14:225-268. 1956
- AGOSTINHO AA, JULIO Jr HF and BORGHETTI JR. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. **Rev Unimar** 14:89-107. 1992
- ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) with 2n=48 chromosomes. **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.
- ALVES, A. L.; PERDICES, A.; REIS, S. F.; OLIVEIRA, C. Phylogeography and evolutionary history of the Neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae) implications for their taxonomy and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. Sub 1
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Molecular phylogenetic analyses of the Loricariidae family (Teleostei: Siluriformes) inferred from mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. Sub 2
- ALVES, A. L. **Análise da evolução da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) baseada em caracteres cromossômicos e de seqüências de DNA**. Tese de Doutorado em Genética, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- ALVES, AL, BROCCHI, M., OLIVEIRA, C., REIS, SF. Hipótese de relacionamento filogenético entre populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) da bacia do rio Paraná. Congresso Brasileiro de Ictiologia, Itajaí, SC. 2007
- AVISE, J. C. & J. FELLE. Population structure of freshwater fishes. 1. Genetic variation of bluegill (*Lepomis macrochirus*) populations in man-made reservoirs. **Evolution** 33: 15–26. 1979
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual. Review of Ecology and Systematics**, v.18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. London: Harvard University Press, 2000.
- BATISTA J. S.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of homing for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n. 4, p. 723-740, 2006.
- BERMINGHAM E.; MCCAFFERTY, S.S.; MARTIN, A.P. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: KOCHER, T.; STEPIEN, C.A. (Ed.). **Molecular Systematics of Fishes**. San Diego, CA: Academic Press, 1997, p. 113-128. 1997
- BERMINGHAM, E., MARIN, A.P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Mol. Ecol.** 7, 499–517. 1998
- BERTACO, V.; MALABARBA, L.R. Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of the Southern Brazil, with comments on the *A. scabripinnis* species complex. **Ichthyology Exploration of Freshwaters**, v. 12, n. 3, p. 221-234, 2001.
- BERTACO, V.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 53-60, 2006.
- BERTACO, V.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 1, p. 25-30, 2007.

BETANCUR-R, R., ACERO, P., BERMNIGHAM, E., COOKE, R. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Molecular Phylog. and Evolution.**, 45: 339-357. 2007

BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. Family Heptapteridae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South America**. Porto Alegre, RS: Edipucrs, 2003. p. 406-431.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce de São Paulo: sistemática. In: Poluição e Psicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, p. 79-108, 1972

BROOK, B.W., TONKYN, D.W., O'GRADY, J.J. & FRANKHAM, R. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. **Conservation Ecology**, 6, 16. 2002

CALCAGNOTTO, D., SCHAEFER, SA., DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phylog. and Evolution**, 36: 135-153. 2005

CARAMASCHI, E.M.P. Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). **Doctoral thesis**, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Brasil. 1986

CARVALHO GR. Evolutionary aspects of fish distribution: Genetic variability and adaptation. **J Fish Biol** 43:53-73. 1993

CARVALHO, E.D., DA SILVA, V.F.B., FUGIHARA, C.Y., HENRY, R. & FORESTI, F. Diversity of fish species in the River Paranapanema Jurumirim Reservoir transition region (São Paulo, Brazil). **Italian J. Zool.** 65:325-330. 1998

CASATTI, L., LANGEANI, F. & CASTRO, R.M.C. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná, SP. **Biota Neotropica** 1(1/2):1-15. 2001

CASATTI, L. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica** 2(2): 1-14. 2002

CASTRO, R. M. C.; Casatti, L.; Santos, H. F., Ferreira, K. M.; *et al.* Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v3 (n1). 2003

CASTRO, R. M. C.; Casatti, L.; Santos, H. F., Melo, A L.; *et al.* Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v4 (n1). 2004

CASTRO R.M.C.; Casatti L, Santos HF, Vari RP, Melo ALA, *et al.* Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 6(3): 193-214. 2005

CLEMENT, M., POSADA, D. e CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.** 9, 1657-1659. 2000.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research.** v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

DERGAM, JA, PAIVA, SR, SCHAEFFER, CE, GODINHO, AF and VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetic. and Mol. Biology**, 25(4): 379-387. 2002

DURAND, J.D., TEMPLETON, A.R., GUINAND, B., IMSIRIDOU, A., BOUVETt, Y. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: implications for Balkan Peninsula biogeography. **Mol. Phylogenet. Evol.** 13, 566–580. 1999

- EIGENMANN, C. H. The American Characidae. Part 1. **Memoirs of Museum of Comparative Zoology**, 43: 1-102. 1917
- EXCOFFIER, L., Smouse, P. E. e Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 136, 343-359. 2000
- FAO. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 150 pp. 2002
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.
- FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.72, n.4, p.297-353, 1981.
- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conservation Biology**, 10, 1500-1508. 1996
- GARCIA SM & GRAINGER RJR. Gloom and doom? The future of marine capture fisheries. **Phil Trans Royal Soc B** 360:21-46. 2005
- GARUTTI V. Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. Livre-Docência **Thesis**, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 1995
- GILLER, P.S. River restoration: seeking ecological standards. Editor's introduction. **Journal of Applied Ecology**, 42, 201-207. 2005
- GODINHO HP and GODINHO AL Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limn Brasil** 5:187-197. 1994
- HALUCH, CF., Abilhoa, V. *Astyanax totae*, a new characidae species (teleostei: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Neotrop. Ichthyol.**, 3(3): 383-388. 2005
- HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Mol. Phylogenet. Evol.** 37, 700-720. 2005
- HARDMAN, M., LUNDBERG, JG. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for "phractocephaline" catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. **Mol. Phylog. and Evolution**, 40: 410-418. 2006
- HENRY, R., UIEDA, V.S., AFONSO, A.A.O. & KIKUCHI, R.M. Input of allochthonous matter and structure of fauna in a Brazilian headstream. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25:1866-1870. 1994
- HUBERT N, DUPONCHELLE F, NUÑEZ J, GARCIA-DAVILA C, PAUGY D e RENNO JF. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molec. Ecol.**, 16: 2115-2136. 2007
- HUECK, K. & SEIBERT, P. Vegetationskarte von Südamerika. **Band IIa**. Fischer, Stuttgart, 90 p. 1981
- LATTA, R.G. Conservation genetics as applied evolution: from genetic pattern to evolutionary process. **Evolutionary Applications**, 1, 84-94. 2008
- LI, C, ORTI, G. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylog. and Evolution.*, 44: 386-398. 2007
- LIMA, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. Pezzi da Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis,

F. Langeani, L. Casatti, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda. Genera Incertae Sedis in Characidae. Pp. 106–169. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs. 729p. 2003

MAGALHÃES, P. C. Hidrologia Superficial em Engenharia Hidrológica. UFRJ/ABRH, 1989.

MELO, FAG., Buckup, PA. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aenus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). **Neotrop. Ichthyol.**, 4(1): 45-52. 2006

MONTOYA-BURGOS, J.-I., MULLER, S., WEBER, C., PAWLOWSKI J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 363–374. 1998

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implication on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Mol. Ecol.**, 12:1855-1867. 2003

MORITA, K., YAMAMOTO, S. & MORITA, S.H. Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: lessons from white-spotted charr in Japan. **Ecological Research**, doi 10.1007/s11284-008-0579-9. 2009

MORRISON, CL, LEMARIE, DP. WOOD, RW., KING., TL Phylogeographic analyses suggest multiple lineages of *Crystallaria asprella* (Percidae: Etheostominae). **Conservation Genetics.**, 7: 129-147. 2006

NERAAS, L. P. & P. SPRUELL. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. **Molecular Ecology** 10: 1153–1164. 2001

ORMEROD SJ Current issues with fish and fisheries: Editor's overview and introduction. **J Appl Ecol** 40:204-213. 2003

ORNELAS-GARCIA C.P., DOMINGUEZ-DOMINGUEZ O. & DOADRIO I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology** 8:340. 2008

OVENDEN J.R., KASHIWAGI T., BRODERICK D., GILES J., SALINI J. The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. **BMC Evolutionary Biology**. 9:40- 1471-2148. 2009

PANCHAL, M. The automation of Nested Clade Phylogeography Analysis. **Bioinformatics Applications Note**, 23(4): 509-510. 2007

PAULY D, WATSON R and ALDER J. Global trends in world fisheries: Impacts on marine ecosystems and food security. *Phil Trans R Soc B* 360:5-12. 2005

PERDICES, A., DOADRIO, I. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Mol. Phylog. and Evolution**, 19(3): 468-478. 2001

PERDICES, A., BERMINGHAM, E., MONTILLA, A. e DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Mol. Phylogenet. Evol.** 25: 172-189. 2002

PERDICES, A.; SAYANDA, D. e COELHO, M. M. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. **Mol. Phylogenet. Evol.**, in press. 2005

PFRENDER, M.E., HICKS, J., LYNCH, M. Biogeographic patterns and current distribution of molecular-genetic variation among populations of speckled dace, *Rhinichthys osculus* (Girard). **Mol. Phylogenet. Evol.** 30, 490–502. 2004

POSADA D, Crandall KA e Templeton AR GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9, 487–488. **Mol. Ecol.** 7, 381–397. 2000

- PURDOM, C.E. Genetics and Fish breeding. Chapman and Hall editors. London. Reis, R. E.; Kullander, S. O. e Ferraris Jr., C. J. (2003). **Check list of the freshwater fishes of South America**, edited by Edipucrs, Porto Alegre, RS. 1993
- REVALDAVES, E., E. RENESTO & M. F. P. S. MACHADO. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana' river. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 381–388. 1997
- REIS, R. E., S. O. KULLANDER & C. J. FERRARIS. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003
- SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher., 2001
- SAMPAIO, T. Relatório dos rios Itapetininga e Paranapanema. **Rev. Inst. Geogr. Geol.** 2(3):222-271. 1944
- SCHAFER, S. A.. Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, & C. A. S. Lucena (eds), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 603 pp. 1998
- SHAFFER, M.L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, 31, 131–134. 1981
- SILFVERGRIP, A.M.C. A systematic revision of the neotropical cat.sh genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). **Swedish Museum of Natural History**, Stockholm. 1996
- SIVASUNDAR, A., BERMINGHAM, E. e ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.** 10, 407-417. 2001
- STRECKER, U., FAÚNDEZ, V.H. e WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome *b* sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.** 33, 469-481. 2004
- SULLIVAN, JP., LUNDBERG, JG. HARDMAN. M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei:Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. **Mol. Phylog. and Evolution**, 41: 636-662. 2006
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. e KUMAR, S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. *Molecular Biology and Evolution*. v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TEMPLETON AR, Boerwinkle E e Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics** 117, 343–351. 1987
- TEMPLETON A. Using haplotypes trees for phylogeographic and species inferences in fish populations. *Environ. Biol. of Fishes*, 69: 7-20. 2004
- UIEDA, V.S., BUZZATO, P. & KIKUCHI, R.M. Partilha de recursos alimentares em peixes em um riacho de serra no Sudeste do Brasil. **An. Acad. Bras. Ci.** 69:243-252. 1997
- VARI, R. P. & MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: An Overview. Pp. 1–11. *In*: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p. 1998
- VASCONCELLOS M & GASALLA MA. Fisheries catches and the carrying capacity of marine ecosystems in southern Brazil. **Fish Res** 50:279-295. 2001
- VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, 53, 394–412. 1998
- XIA, X. e XIE. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. v. 92, p. 371-373, 2001.

WEITZMAN SH and FINK WL. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of new world characiforms. **Bull Mus Com Zool Harv** 150(6):339-395. 1983

WEITZMAN, S. H. & L. R. Malabarba. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). Pp. 161–170. In: L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre. 603p.1998

WILLIS, S.; NUNES, MS; MONTANA, C.; FARIAS, IP; LOVEJOY, N. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses Cichla (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 291-307. 2007

ZANATA AM. Estudo filogenético e revisão taxonômica das espécies de Tetragonopterinae com espinho pélvico (Characidae; Characiformes). **Master's Thesis**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1995

ZARDOYA, R., DOADRIO, I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. **J. Mol. Evol.** 49, 227–237. 1999

ZIESLER, R. & ARDIZZONE, G.D. The inland waters of Latin America. **Copescap Technical Paper No. 1**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, 171 p, 1979