

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ZOOLOGIA

Morfologia comparativa de

Astyanax fasciatus e *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae)

através de análises de morfometria geométrica

DOUTORADO

PALOMA APARECIDA DE LIMA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO CARDOSO BENINE

Botucatu - SP
2016

Morfologia comparativa de
Astyanax fasciatus e *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae)
através de análises de morfometria geométrica

PALOMA APARECIDA DE LIMA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO CARDOSO BENINE

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Zoologia, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Área de concentração: Zoologia.

Botucatu - SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima, Paloma Aparecida de.

Morfologia comparativa de *Astyanax fasciatus* e
Astyanax scabripinnis (Characiformes: Characidae) através
de análises de morfometria geométrica / Paloma Aparecida
de Lima. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Ricardo Cardoso Benine
Capes: 20400004

1. *Astyanax* (Peixe). 2. Morfometria. 3. Zoologia -
Variação. 4. Characideo.

Palavras-chave: *Astyanax*; Diferenciação morfológica;
Morfometria.

**Laboratório de
Sistemática e
Evolução de peixes**

*"Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as
decepções do passado."*

(Clarice Lispector)

Dedico este estudo à minha querida família...

*... Aos meus pais, Luiz e Isabel, que sempre estiveram ao meu lado,
incentivando-me a não desistir!*

... Ao meu esposo, Alan. Seu apoio foi e sempre será essencial!!!

AGRADECIMENTOS

Quem me conhece, sabe que não foi fácil chegar até aqui. Então, eu agradeço a todos que participaram de alguma forma dessa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus. Sim, pois sem a força necessária para continuar, eu teria desistido. E essa força, sem dúvida, veio Dele!

Aos meus pais, por acreditarem em mim, em meus sonhos.

Agradeço ao meu esposo, amigo e companheiro. Sempre com uma palavra de incentivo. Obrigada pela paciência!

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Cardoso Benine. Obrigada pela oportunidade. Essa frase faz todo o sentido, pois abriu as portas do seu laboratório e aceitou uma aluna em uma situação não tão normal...rs. Sem essa oportunidade, essa tese não existiria. Muito obrigada, de coração.

Ao Prof. Dr. Reinaldo José da Silva, pelo apoio, conselhos e ajuda no decorrer da minha trajetória.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”) pela infraestrutura utilizada na realização dos experimentos e pesquisa.

À Coordenação de Desenvolvimento do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Ao departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, em especial ao Professor Doutor Cláudio de Oliveira, pela utilização de material contido na coleção ictiológica (LBP).

Ao departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, agradeço aos seus funcionários e alunos da pós-graduação pelo auxílio e pela disponibilidade do equipamento de radiografia utilizado na presente tese.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia: Flávio da Silva, Hamilton A. Rodrigues, Juliana Ramos, Sílvio César de Almeida e à Seção de Pós-Graduação. Muito obrigada a todos, pela grande paciência, competência e profissionalismo.

Aos companheiros de laboratório: Bárbara, Marina, Carol, Valter e James. Obrigada pela ajuda nas coletas (em especial ao Valter), pela convivência e todas as conversas (científicas ou não). Foram importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O gênero *Astyanax* é taxonomicamente complexo e possui grande diversidade de espécies. O número de espécies válidas ultrapassa 140 e, provavelmente, um número maior está por ser descrito. Diversos autores indicam a existência de complexos de espécies, como por exemplo, para *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis*. Análises do gene Citocromo C Oxidase subunidade 1 (COI) mostraram que essas espécies apresentam distância intra-específica menor que 2%, o que indicaria, em teoria, não só a inexistência de tais complexos, como que estas representam uma única espécie. Apesar da elevada proximidade genética, as espécies em questão apresentam diferenciação morfológica bem descrita e demonstrada na literatura e suas identidades nunca foram questionadas. No entanto, dado o alto grau de similaridade genética, um estudo morfológico mais detalhado pode trazer informações inéditas sobre a evolução e transformação de caracteres e/ou apontar para um grau de semelhança, em algum nível, não detectado pelos métodos tradicionais. O presente estudo tem o intuito de quantificar a diferenciação entre essas espécies e avaliar se existem diferentes graus de diferenciação morfológica em indivíduos jovens e adultos e inferir se a elevada similaridade genética se reflete em algum estágio do desenvolvimento dessas espécies. Para isso, espécimes de diferentes classes de tamanho foram radiografados e analisados através do método de morfometria geométrica. Os marcos anatômicos apresentaram diferenças significativas entre as espécies e uma maior diferença entre os grupos ontogenéticos. Tanto os jovens e adultos dentro da mesma espécie, como os jovens e os adultos de *A. fasciatus* quando comparados com os de *A. scabripinnis* possuem o mesmo grau de diferenciação morfológica. O formato do corpo de *A. scabripinnis* parece estar relacionado com o ambiente em que normalmente são encontrados, como

rios de correntezas moderadas e em riachos localizados nas cabeceiras em locais com forte correnteza. Normalmente, nesses ambientes são encontrados peixes com um formato do corpo fusiforme e mais alongados, para a redução do gasto de energia e produzir natação prolongada, o que confirma os resultados aqui encontrados. O formato generalizado do corpo de *A. fasciatus* está relacionado a nadadores ativos em ambientes mais lênticos, também confirmado pelas análises aqui apresentadas. Assim, embora extremamente similares geneticamente, ambas as espécies acumularam, num provável curto espaço de tempo (dada à similaridade genética), um alto grau de diferenciação morfológica que, provavelmente, as impedem de se reconhecerem como uma única espécie. Reforça-se, assim, a afirmação de que a proposta de um *DNA Barcode*, através da análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I, deve ser empregada apenas como evidência adicional na identificação e proposição de novas espécies em peixes caracídeos.

Palavras-chave: *Astyanax*; COI; DNA Barcode; diferenciação morfológica; morfometria.

ABSTRACT

The genus *Astyanax* is taxonomically complex and has great diversity of species. The number of valid species exceeds 140 and probably a greater number is to be described. Several authors indicate that there are species of complexes, as for example, *A. fasciatus* and *A. scabripinnis*. Analysis of cytochrome c oxidase subunit 1 gene (IOC) have shown that these species exhibit intraspecific distance lower than 2%, which indicates, in theory, not only the absence of such complexes, but they also represent a single species. Despite the high genetic closeness, the species in question show an already well described morphological differentiation demonstrated in the literature and their identities were never questioned. However, given the high degree of genetic similarity, a more detailed morphological study can bring new information on the evolution and transformation of characters and/or point to a degree of morphological similarity, at some level, not detected by traditional methods. This study aims to quantify the differentiation between these species and to assess whether there are different degrees of morphological differentiation in young and adults and to infer if the high genetic similarity is reflected in some stage of development of these species. For this, specimens of different size classes were radiographed and analyzed by geometric morphometric method. The anatomical landmarks showed significant differences between species and a greater difference between the ontogenetic groups. Both young and adults within the same species, such as young people and adults of *A. fasciatus* compared to the *A. scabripinnis* have the same degree of morphological differentiation. The body shape of *A. scabripinnis* seems to be related to the environment in which they are usually found, as rivers of moderate currents and streams located in the headwaters in places with strong current. Typically, in these environments are found fish with fusiform and

elongate body to reduce energy used and to produce prolonged swimming, confirming the results found herein. The general format of the body of *A. fasciatus* is related to active swimmers in more lentic environments, also confirmed by our analysis. Thus, although extremely similar genetically, both species accumulated in a likely short time (given the genetic similarity), a high degree of morphological differentiation that probably prevents them to recognize as a single species. There exists, therefore, the claim that the proposal of a DNA Barcode, through the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I analysis, should be used only as additional evidence in the identification and proposal of new species in characins fish.

Keywords: *Astyanax*; COI; DNA Barcode; morphological differentiation; morphometry;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) e (B) *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819).

Figura 2 - Equipamento de Raio-X utilizado para radiografar os espécimes dos complexos de *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis* do presente trabalho.

Figura 3 - Radiografia de um espécime de *Astyanax* sp. Localização dos marcos anatômicos.

Figura 4 – Regressão multivariada da forma (Coordenada de Procrustes) vs. tamanho (Tamanho do Centróide) para os dados totais das duas espécies do gênero *Astyanax* analisadas: *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*.

Figura 5 – Análise de componentes principais da variação de forma corporal (Resíduos da regressão da forma vs. tamanho) de duas espécies do gênero *Astyanax*, destacando seus grupos ontogenéticos. Diagramas de variação corporal do tipo ‘outline drawing’ para cada variação final dos eixos das componentes 1 (PC1+; PC1-) e 2 (PC2+; PC2-).

Figura 6 – Análise de variáveis canônicas de duas espécies do gênero *Astyanax*, destacando seus grupos ontogenéticos. Diagramas de variação corporal do tipo ‘outline drawing’ para cada variação final dos eixos das canônicas 1 (CV1+; CV1-) e 2 (CV2+; CV2-).

Figura 7 – Outline drawing da comparação de forma corporal entre espécies a partir dos scores da análise de função discriminante.

Figura 8 – Outline drawing da comparação de forma corporal ontogenética, separadamente para cada espécie, a partir dos scores da análise de função discriminante.

Figura 9 – Outline drawing da comparação de forma corporal Espécies vs. Ontogenia, a partir dos scores da análise de função discriminante.

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Lotes utilizados no presente estudo e localizados na coleção do Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu.

Tabela II - *Astyanax* sp. Lista de marcos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica.

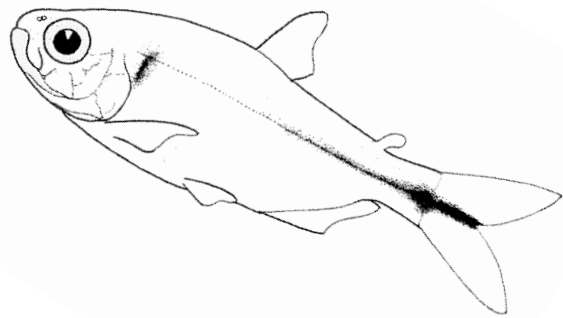
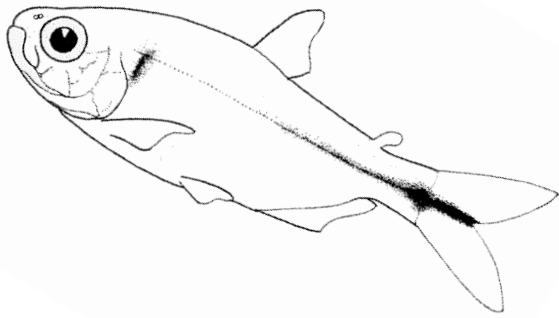
Tabela III – Estatística da CVA e teste de permutações entre as distâncias de Procrustes dos grupos ontogenéticos de cada espécie de *Astyanax*. CV – Eixos das variáveis canônicas, %Var – Porcentagem de variância dos dados, %CumVar – Porcentagem cumulativa de variância dos dados. fas – *A. fasciatus*, sca – *scabripinnis*, J – jovem, A – Adulto. Valores destacados de negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela IV - Matrizes de validação cruzada da Análise de função discriminante em diversos fatores (Espécies, Ontogenia e Espécies vs. Ontogenia). fas – *A. fasciatus*, sca – *scabripinnis*, J – jovem, A – Adulto.

SUMÁRIO

Introdução	16
Ordem Characiformes	16
Família Characidae	18
O gênero <i>Astyanax</i>	18
Caracterização de indivíduos e populações	20
Hipótese	23
Objetivos.....	25
Material e Métodos	27
Material biológico	27
Morfometria geométrica	28
Resultados	34
Discussão	44
Referências	51

INTRODUÇÃO



Introdução

Os peixes, dentre os vertebrados, correspondem ao grupo mais antigo, numeroso e diverso e, segundo Eschmeyer & Fong, (2010), o número de espécies válidas pode ultrapassar 32.000. A partir desse número, o ambiente de água doce abrange 13.000 espécies, sendo que aproximadamente 6.000 estão presentes na região Neotropical, mas algumas (cerca de 1.500) ainda não foram descritas formalmente (Reis et al. 2003). A ictiofauna de água doce da região Neotropical é, portanto, a mais rica de todo o mundo. Considerando todas as espécies encontradas 37% são Siluriformes, 33% Characiformes, 9% Ciclídeos, 8% Cyprinotiformes, 3% Gymnotiformes e 7% pertencem a outras ordens menores (Reis et. al. 2003).

Ordem Characiformes

A ordem Characiformes é uma das mais abundantes entre os peixes de água doce, compreendendo 23 famílias, 270 gêneros e 2.079 espécies (Eschmeyer & Fong, 2015). Indivíduos da ordem podem ocorrer na África, sul da América do Norte, Américas Central e do Sul, sendo que sua maior diversidade está presente na região Neotropical. Fósseis foram encontrados na Europa (Portugal, França e Itália) e no Oriente Médio (Gayet, 1981; Otero & Gayet, 2001).

A fauna africana de Characiformes inclui aproximadamente 220 espécies, enquanto que do outro lado do Atlântico mais de 1.700 espécies são conhecidas, do sul dos Estados Unidos até o sul da América do sul. Em relação as principais bacias da América do Sul, aproximadamente 500 espécies são conhecidas do rio Orinoco (Lasso et al. 2004), sendo que um número comparável vive nos rios da drenagem do Escudo das Guianas (Vari et al. 2009). Um número maior e desconhecido está presente na bacia

Amazônica e outras espécies habitam sistemas de drenagens na América Central, México e em outros locais da América do Sul.

Sendo um dos maiores grupos de peixes de água doce, a ordem apresenta pelo menos 1.953 espécies válidas (Nelson 2006; Eschmeyer & Fong, 2010), exibindo grande variedade de formas e tamanhos corporais, habitando lagos e rios do continente africano e região neotropical (Géry, 1977). A ordem Characiformes apresenta peixes que podem ser diferenciados dos demais grupos por possuir o corpo totalmente coberto por escamas finas (exceto na cabeça), pela presença de nadadeiras pélvicas ou ventrais geralmente situadas atrás da inserção das nadadeiras peitorais, pela ocorrência de raios das nadadeiras moles não transformados em espinhos pungentes e, geralmente, pela presença de uma nadadeira adiposa (Britski et al. 1999). Possuem também, grande variação na estrutura da mandíbula e anatomia interna (Vari, 1998), tem dieta diversificada e podem ser encontrados em diferentes ecossistemas (Buckup, 1998). Existem espécies cujas formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total, as chamadas espécies miniaturas (Weitzman & Vari, 1988) até espécies com cerca de 100 cm de comprimento.

Algumas espécies possuem grande importância ecológica e econômica para o Brasil em relação à pesca comercial, esportiva e aquicultura. Há ainda um grande número de espécies, principalmente da família Characidae, exportadas com finalidade ornamental e também aquelas que podem servir como indicadores biológicos por viverem em igarapés, locais estes que devem manter um bom estado de conservação (Chao et al. 2001).

Família Characidae

Dentro da ordem Characiformes, a família Characidae é o grupo mais diversificado (Malabarba et al. 1998; Reis et al. 2003; Oliveira et al. 2011). Indivíduos pertencentes a essa família ocorrem em todos os ambientes de água doce da região Neotropical e no continente africano (Lucena, 1993). Os seus representantes são popularmente conhecidos como tambiús, lambaris, matrinhãs, dourados, entre outros. Seus hábitos alimentares são bem diversificados e exploram uma grande variedade de habitats.

O monofiletismo de Characidae ainda é controverso, segundo estudos morfológicos. A primeira hipótese filogenética abrangente de base cladística para os Characiformes foi publicada por Buckup (1998). O número de espécies válidas é cerca de 1100, sendo que 218 foram descritas na última década (Eschmeyer & Fong, 2014). Atualmente, as seguintes subfamílias são incluídas em Characidae: Agoniatinae, Clupeacharacinae, Iguanodectinae, Bryconinae, Serrasalminae, Aphyocharacinae, Characinae, Stethaprioninae, Tetragonopterinae, Triportheinae, Rhoadsiinae, Cheirodontinae, Glandulocaudinae e Stevardiinae (Reis et al. 2003; Weitzman, et al. 2005; Buckup, 2007), e 88 gêneros são considerados *incertae sedis* (Lima et al. 2003). É, sem dúvida, a família com os maiores problemas taxonômicos e filogenéticos dentre os Characiformes.

O gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* Baird & Girard (1854), compreende peixes de pequeno porte conhecidos popularmente como lambaris ou piabas, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (Géry, 1977). São amplamente distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Bertaco & Lucena, 2006). Esta extensa distribuição

provavelmente deve-se a grande capacidade dos indivíduos de se ajustarem às condições ambientais diferenciadas e também à ampla interação nas assembleias de peixes (Orsi et al. 2004).

Os representantes do gênero possuem como principais características morfológicas: nadadeira adiposa geralmente presente, linha lateral completa pouco curva na frente, pré-maxilar não protrátil, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes, dentes com cúpides, altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão e escamas de tamanho normal cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski et al. 1988). São peixes não migradores, com fecundação externa e sem cuidado parental (Vazzoler & Menezes, 1992).

Através de uma análise filogenética, tendo como base o estudo de 360 caracteres morfológicos, o gênero *Astyanax* pode ser considerado polifilético (Mirande, 2010). Sua representatividade é grande e complexa, com um número expressivo de indivíduos, sendo atualmente identificadas 142 espécies válidas, sendo 52 destas descritas nos últimos 10 anos (Eschmeyer & Fong, 2014; Froese & Pauly, 2014) e, provavelmente um número razoável de espécies ainda a serem descritas (Melo, 2001). Este é um dos mais especiosos gêneros da família Characidae e encontra-se como *Incertae sedis* (Lima et al. 2003). Diversos autores indicam a existência de complexos de espécies, como por exemplo, para *A. bimaculatus*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis*, *A. hastatus* e para as espécies endêmicas do rio Iguaçu (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Garutti & Britski, 2000; Bertaco & Lucena, 2006; Melo & Buckup, 2006; Pie et al. 2009; Kavalco et al. 2009).

Através dos resultados de análises citogenéticas e morfológicas, *A. scabripinnis* corresponde, provavelmente, à um complexo de espécies (Moreira-Filho & Bertollo, 1991) e este seria composto por cerca de 15 espécies (Bertaco & Lucena, 2006). Já *A.*

fasciatus seria um complexo composto por diversas espécies, das quais somente as provenientes do rio São Francisco representariam, de fato, *A. fasciatus*, enquanto que as outras espécies do leste do Brasil, América Central e rio Paraná seriam espécies semelhantes, nomeadas *Astyanax* sp. aff. *fasciatus* (Melo & Buckup, 2006; Pazza et al. 2008).

Em relação aos principais caracteres diagnósticos, é possível afirmar que as espécies do complexo *A. scabripinnis* possuem altura do corpo entre 2,6 e 3,6 vezes no comprimento padrão, cabeça robusta e corpo também robusto na altura das nadadeiras peitorais, quatro dentes usualmente presentes na série externa do pré maxilar e de um a sete dentes no maxilar (Eigenmann, 1921 e 1927), número reduzido de raios ramificados na nadadeira anal (entre 13 e 21, geralmente 17 e 18 e raramente 22 ou 23) e a presença de uma ou duas manchas umerais (Bertaco & Lucena, 2006). As espécies de *A. fasciatus*, possuem 25 ou mais raios na nadadeira anal, mancha umeral alongada, faixa lateral prateada tornando-se preta no pedúnculo caudal se estendendo sobre os raios caudais medianos e um ou mais dentes no osso maxilar, raramente três (Eigenmann, 1921).

Caracterização de indivíduos e populações

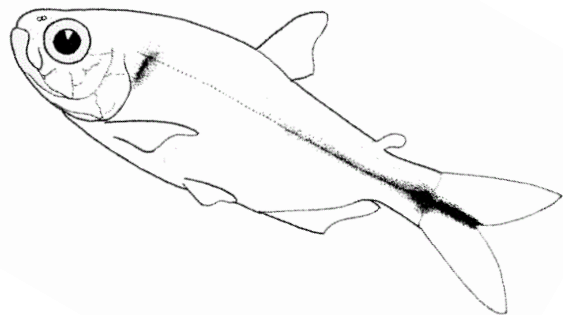
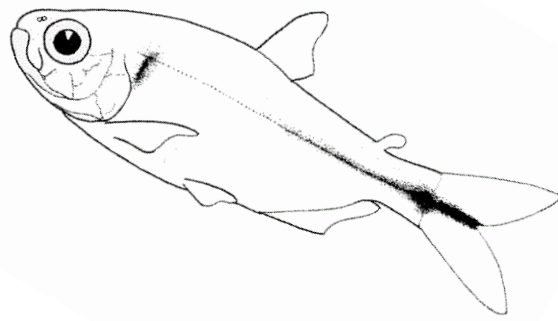
Métodos desenvolvidos através do progresso da genética molecular têm permitido a caracterização genética de indivíduos e populações. O gene mitocondrial COI (gene da citocromo *c* oxidase subunidade 1), é um importante marcador molecular para códigos de barras genético de animais, por ser espécie-específico e apresentar alta variabilidade interespecífica (Hebert et al. 2003). Alguns estudos propõem análises baseadas em distância, como modelos para a delimitação de espécies, com valores de

2% e 3%, que são mais comuns em estudos de peixes tropicais (Lara et al. 2010; Carvalho et al. 2011; Mabragana et al. 2001; Pereira et al. 2013).

Resultados verificados a partir de análises do gene COI apontam a presença de um grupo de espécies, com distância intra-específica menor de 2%, envolvendo *Astyanax fasciatus*, o que indicaria a presença de uma única espécie. As espécies pertencentes a esse grupo são: *A. bifasciatus*, *A. scabripinnis*, *A. eigenmanniorum*, *A. pampa*, *A. fasciatus*, *A. biotae* e *A. parahybae* (*sensu* Rossini & Oliveira, em preparação). Os autores sugerem maior atenção para a definição das espécies do grupo *A. fasciatus*, uma vez que este não parece seguir os padrões verificados na literatura.

Existe uma complexa interação entre genótipo, fenótipo e o ambiente em que uma população se encontra. Alguns autores afirmam que espécies de uma mesma população podem apresentar alterações fenotípicas quando amostradas em diferentes locais como, por exemplo, ambientes lóticos e lênticos (Haas et al. 2010; Franssen, 2011, Cureton & Broughton, 2014). Desse modo, a variação na biodiversidade pode ser superestimada (ou subestimada) se for baseada a partir de uma única abordagem. Apesar das divergências entre taxonomistas tradicionais (morfologistas) e os estudos com base em dados moleculares, é muito provável que o uso integrado de dados genéticos e morfológicos possam fornecer subsídios mais consistentes no entendimento e delimitação de espécies. Partindo desse pressuposto, um amplo estudo para um maior entendimento e quantificação das formas e suas variações pode fornecer subsídios para a detecção e compreensão dos processos responsáveis pela sua variação. Para isso, métodos utilizando morfometria geométrica estão amplamente detalhados na literatura (Sidlauskas et al. 2006; Sidlauskas, 2008; Monteiro, 2013; Klingenberg & Marugan-Lobón, 2013).

HIPÓTESE

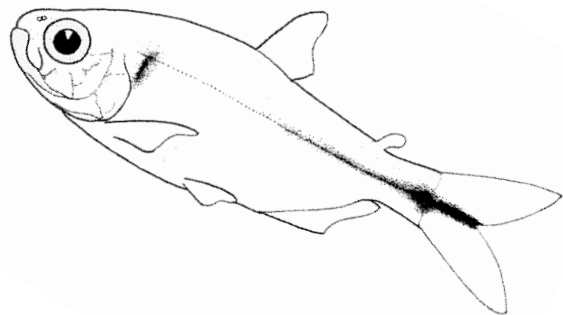
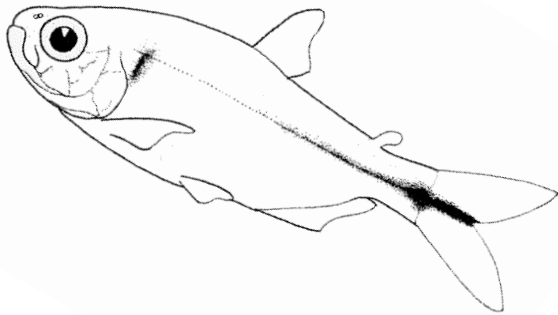


As espécies *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis* (Figura 1) são geneticamente muito similares (<2% de distância genética), apesar das diferenças morfológicas utilizadas para diagnosticá-las. O presente estudo sugere que os resultados provenientes das análises de morfometria geométrica irão trazer um melhor entendimento da variação das formas e assim, apontar que os indivíduos em questão, apesar de sua elevada similaridade, são bastante diferentes morfológicamente e, assim, consideradas espécies distintas.



Figura 1 - (A) *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) e (B) *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819).

OBJETIVOS



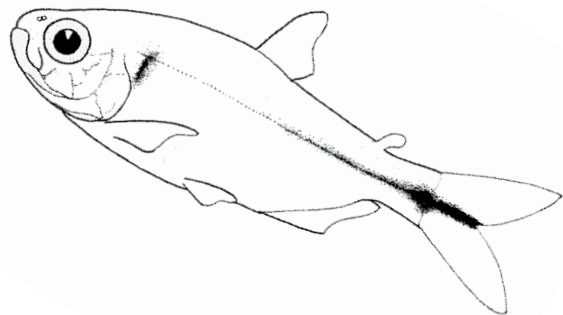
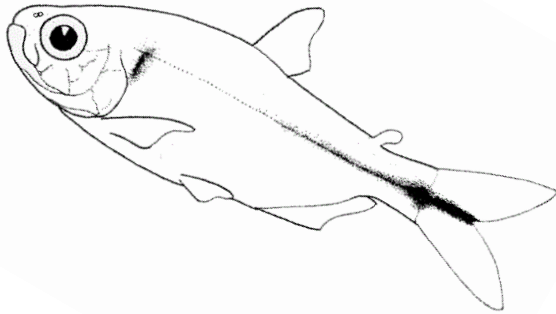
Objetivo Geral

Avaliar a variação morfológica entre as espécies *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis*, apesar do alto grau de similaridade genética verificado entre elas (*sensu* Rossini & Oliveira, em preparação).

Objetivos Específicos

- Quantificar a diferenciação morfológica entre as espécies *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis*;
- Avaliar a existência dos diferentes graus de diferenciação morfológica em indivíduos jovens e adultos dentro da mesma espécie e entre combinações dos grupos ontogenéticos *vs.* as espécies em questão;

MATERIAL E MÉTODOS



Material biológico

Para este estudo, os espécimes aptos à serem radiografados (os que não estavam distorcidos devido a fixação) foram retirados e posteriormente devolvidos para coleção zoológica do departamento de Zoologia da UNESP, campus de Botucatu (Tabela I).

Tabela I - Lotes utilizados no presente estudo e localizados na coleção do Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu.

	<i>Astyanax fasciatus</i>	<i>Astyanax scabripinnis</i>
	97	966
	6218	281
	10425	605
Lotes	4033	939
(LBP)	6283	CP*
	CM*	CT*
	BT*	CSN*

*CM: Carmo/MG

*BT: Botucatu/SP

*CP: Cachoeira do Poço/MG

*CT: Cascata /SP

*CSN: Cachoeira sem nome/MG

Foi analisado um total de 189 indivíduos, sendo 92 espécimes de *Astyanax fasciatus* e 97 de *A. scabripinnis*. Os indivíduos de cada espécie foram separados em grupos ontogenéticos, para melhor aproveitamento dos dados para as análises de morfometria geométrica: *A. fasciatus* adultos: 26 indivíduos, *A. fasciatus* jovens: 66, *A. scabripinnis* adultos: 08 e *A. scabripinnis* jovens: 89. Segundo Veregue & Orsi (2003), os peixes (*Astyanax scabripinnis parane*) com tamanho superior a 5.04 cm de comprimento total eram maduros sexualmente (adultos). Os indivíduos utilizados no presente estudo foram mensurados em relação ao comprimento total, com um paquímetro digital com precisão de 0.1 mm.

Morfometria geométrica

As análises morfométricas geométricas utilizadas neste estudo foram baseadas na definição de forma ('shape') e todas as suas configurações geométricas, exceto tamanho, posição e orientação (Klingenberg et al. 2012) utilizando os marcos anatômicos para extração da informação da forma através da Superimposição de Procrustes (Dryden & Mardia, 1998).

Neste estudo, foi avaliada a estrutura corporal geral em duas espécies do gênero *Astyanax*, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*. A região lateral esquerda do corpo dos espécimes foi fixada como a padrão para obtenção das imagens. As imagens foram capturadas utilizando um sistema de Raio-X (Faxitron X-Ray) (Figura 2).



Figura 2 - Equipamento de Raio-X (FFCLRP-USP) utilizado para radiografar os espécimes dos complexos de *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis* do presente trabalho.

Para todas as capturas de imagens, as estruturas corporais foram posicionadas no plano central (vertical e horizontal) do quadro de imagem. Além disso, em todas as imagens uma régua graduada em milímetros foi inserida para futuro escalonamento dos pixels em função do tamanho em milímetros. O software tpsUtil (Rohlf, 2008) foi utilizado para ordenar as imagens digitalizadas de uma mesma estrutura corporal em um mesmo arquivo no formato TPS. Em adição, o software tpsDig2 (Rohlf, 2006) foi utilizado para registrar os marcos anatômicos em cada imagem digitalizada. Os marcos anatômicos foram escolhidos a partir de Sidlauskas et al. (2011) e Park et al. (2013), com algumas modificações (Figura 3, Tabela II).

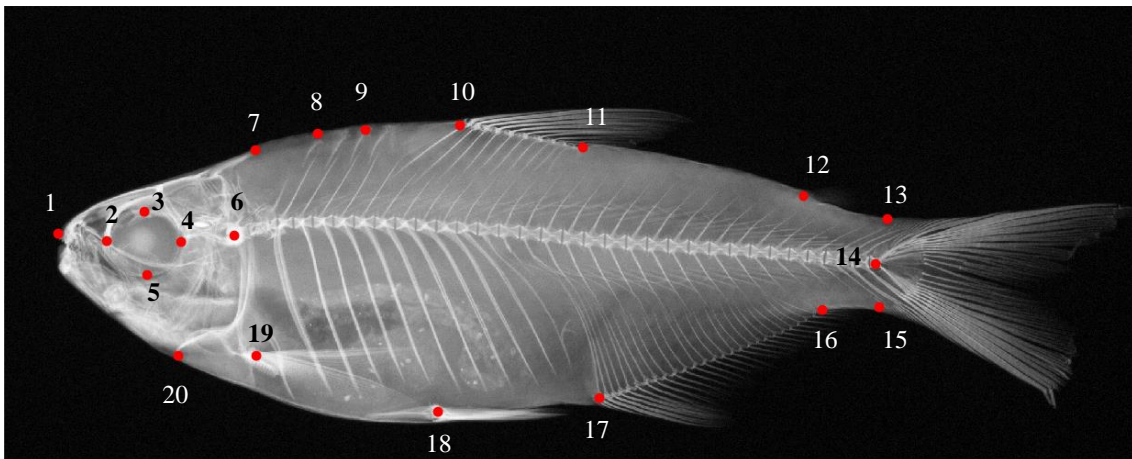


Figura 3 - Radiografia de um espécime de *Astyanax fasciatus* (LBP-10425).
Localização dos marcos anatômicos.

Tabela II - *Astyanax* sp. Lista de marcos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica.

Marcos anatômicos	Descrição
1	Porção anterior da mandíbula superior (ponta do focinho)
2	Limite anterior da órbita
3	Limite dorsal da órbita
4	Limite posterior da órbita
5	Limite ventral da órbita
6	Porção entre a base occipital e a primeira vértebra do aparelho de Weber
7	Limite posterior do supraoccipital
8	Porção dorsal limite em direção à primeira vértebra
9	Porção dorsal limite em direção à terceira vértebra
10	Origem do primeiro raio da nadadeira dorsal
11	Inserção do último raio da nadadeira dorsal
12	Origem da nadadeira adiposa
13	Base dorsal da membrana da nadadeira caudal
14	Porção posterior do pedúnculo caudal
15	Base ventral da membrana da nadadeira caudal
16	Base posterior da nadadeira anal
17	Base anterior do primeiro raio da nadadeira anal
18	Base anterior da nadadeira pélvica
19	Base anterior da nadadeira peitoral
20	Região ventral da cabeça

As configurações dos marcos anatômicos foram submetidas a uma Análise Generalizada de Procrustes (GPA). A análise Generalizada de Procrustes é um procedimento que retira as informações não relacionadas à variação da forma corporal devido a posição, tamanho e rotação dos espécimes (Rohlf & Slice, 1990).

Uma regressão multivariada (agrupada entre grupos ontogenéticos e espécies) das coordenadas de Procrustes (Forma) no tamanho de centróide (Tamanho) foi empregada para analisar a variação de forma pelo efeito alométrico (Drake & Klingenberg, 2008). A porcentagem de predição alométrica na variação de forma também foi computada por meio da métrica de Procrustes (Godall, 1991; Klingenberg &

McIntyre, 1998). A significância estatística das regressões alométricas foi testada por meio de um teste de permutações contra a hipótese nula de independência alométrica (Good, 2000).

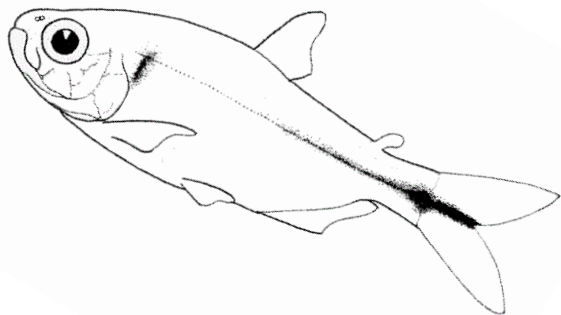
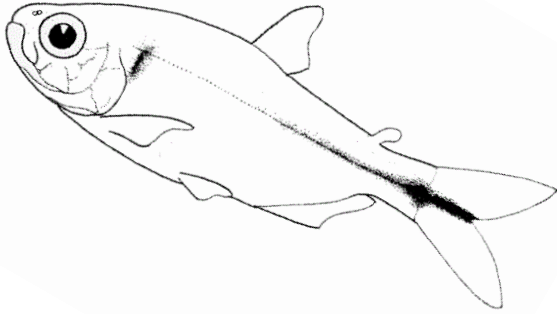
Para comparar as variações de forma, entre as espécies sem diferenças na composição de tamanho corporal dos espécimes e, também, controlando os efeitos alométricos estáticos e ontogenéticos, utilizou-se uma correção alométrica, de acordo com os procedimentos propostos por Sidlauskas et al. (2011) e Alencar et al. (2014). Para isto, os resíduos da regressão multivariada da forma sob o tamanho de centróide foram utilizados para as subseqüentes análises estatísticas. A definição de alometria estática e ontogenética usadas neste trabalho foram baseados em Cock (1966). Os resíduos da regressão foram usados para obter futuros resultados de variação da forma corrigidos por efeito alométrico (ontogenético ou estático) (Alencar et al. 2014).

Análise de Componentes Principais (PCA), Variáveis Canônicas (CVA) e Função Discriminante (DFA) foram usadas para avaliar a variação de forma e verificar diferenças entre espécies, entre grupos ontogenéticos e, secundariamente, entre combinações de grupos ontogenéticos *vs.* espécies. Uma PCA (Jolliffe, 2002) a partir dos resíduos da regressão multivariada foi realizada para produzir um morfo-espço dos principais padrões de variação dos dados e possíveis relações relevantes. As primeiras componentes principais (PC) que contabilizaram mais que 70% de variação dos dados e suas deformações gráficas da forma foram avaliadas. No entanto, para fins demonstrativos foram inseridos aqui somente as visualizações gráficas das duas primeiras componentes. A CVA (Albrecht, 1980) foi utilizada para obter uma visualização geral das variações entre grupos ontogenéticos *vs.* espécies. Enquanto a DFA foi utilizada para gerar as variações de forma finais entre espécies, independente da variação ontogenética, e em seguida, entre grupos ontogenéticos, para cada espécie e,

por fim, na comparação entre grupos ontogenéticos vs. espécies. A escolha por análises de DFA considerando todas as combinações possíveis foi incluída para gerar resultados quantitativos e visuais de possível variação de forma que possam ser utilizadas em futuras avaliações sistemáticas para o gênero. Nas comparações realizadas na CVA e na DFA foram computados os valores de probabilidade a partir do teste de permutações ($n = 10000$) para a distância de Procrustes. Os valores de distância de Procrustes foram preferidos ao invés da distância de Mahalanobis pelo fato de que a primeira é a medida de quantidade absoluta de variação da forma enquanto a segunda, é uma medida relativa de variação da forma (Klingenberg & Monteiro, 2005). Ainda, foram computadas as porcentagens de assinalação correta da matriz de validação cruzada obtida na DFA.

Variações de forma obtidas a partir da PCA, CVA e DFA foram visualizadas através de gráficos do tipo ‘outline drawing’. Gráfico do tipo ‘outline’ trata-se de um tipo de representação alternativo da estrutura corporal sob estudo que facilita a interpretação das mudanças de forma a partir da forma consensual (forma média). Todas as informações necessárias para a elaboração do gráfico ‘outline drawing’ vem das coordenadas de marcos anatômicos. Análise Generalizada de Procrustes, regressões multivariadas, análises multivariadas de PCA, CVA, DFA e, gráficos ‘outline drawing’ foram realizados no programa MorphoJ 1.02b[®] (Klingenberg, 2011).

RESULTADOS



Os marcos anatômicos posicionados nas estruturas corporais analisadas apresentaram diferenças significativas entre as espécies e entre os grupos ontogenéticos. Independência alométrica da forma não foi observada ($p < 0,001$; porcentagem de predição alométrica = 32,56%) (Figura 4). Dessa forma, como mencionado anteriormente, somente os resíduos (da regressão multivariada da forma pelo tamanho) foram utilizados nas análises de comparação de tamanho observadas para cada estrutura.

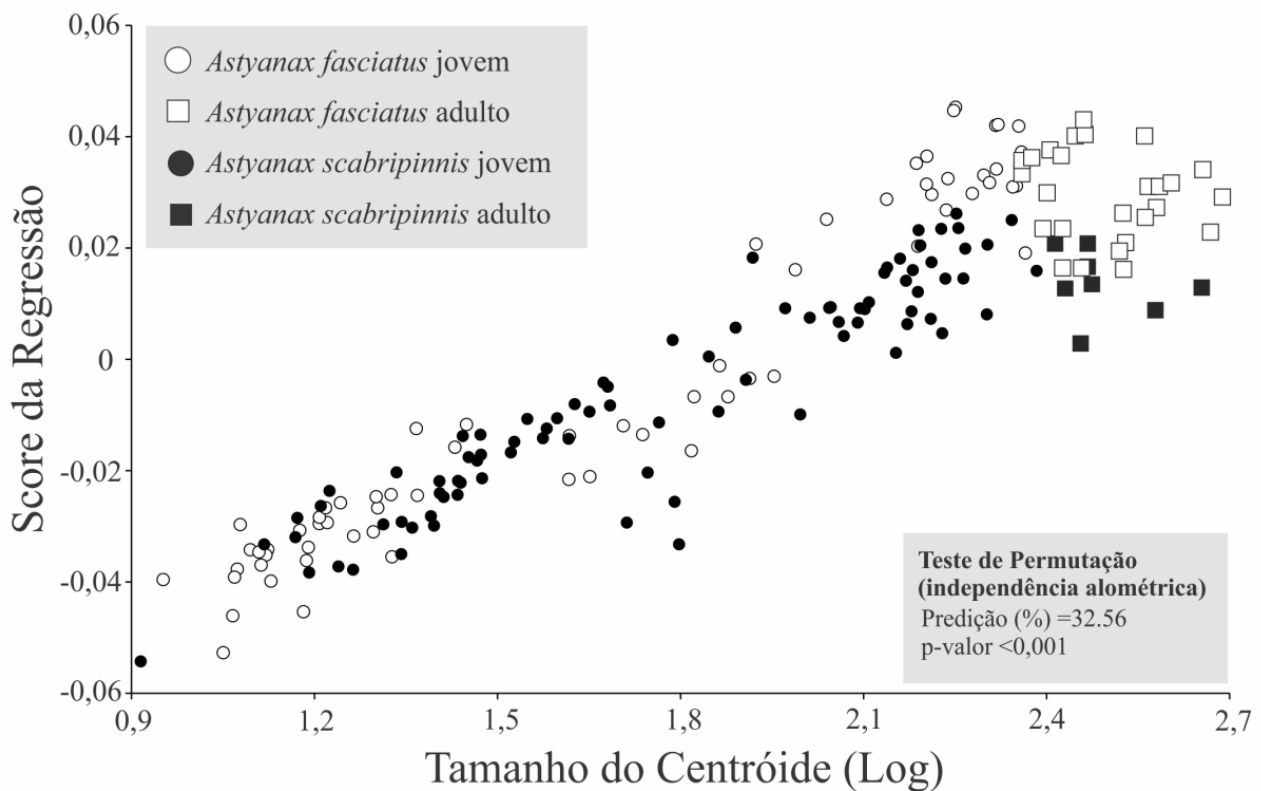


Figura 4 – Regressão multivariada da forma (Coordenada de Procrustes) vs. tamanho (Tamanho do Centróide) para os dados totais das duas espécies do gênero *Astyanax* analisadas: *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*.

A análise de PCA apresentou resultados de variação de forma semelhantes dentre as componentes principais que somaram mais de 70% de variação, revelando que as espécies estudadas aqui apresentam um compartilhamento de variações corporais dentro de um mesmo morfo-espaco. Foi possível notar que a maioria dos espécimes ($n > 70\%$) de cada espécie apresenta uma tendência de variação corporal e, uma área de sobreposição de variação morfométrica geométrica (Figura 5). Dessa forma, variações corporais no sentido positivo da componente principal 1 (PC1+) apresentaram maior tendência de forma corporal para a espécie *Astyanax scabripinnis* enquanto, no sentido negativo da componente principal 1 (PC1-) a variação corporal apresentou maior tendência para a espécie *Astyanax fasciatus*.

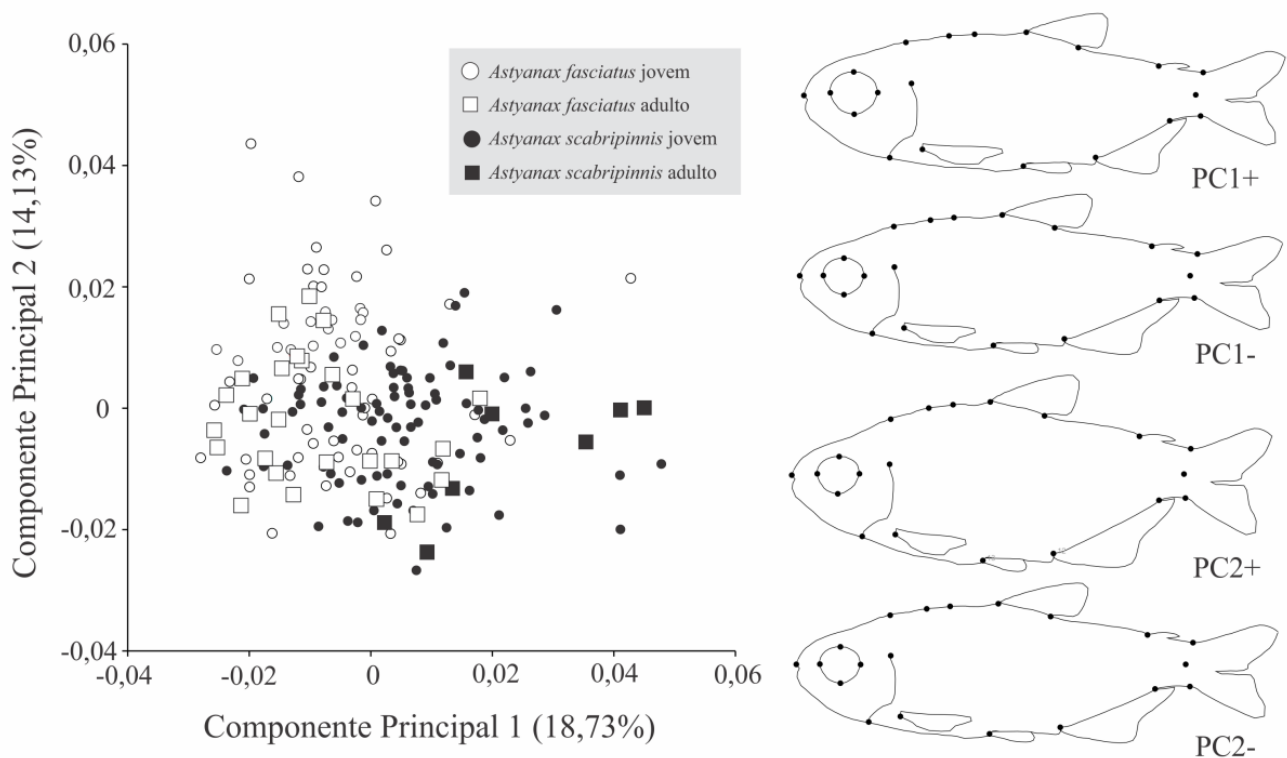


Figura 5 – Análise de componentes principais da variação de forma corporal (Resíduos da regressão da forma vs. tamanho) de duas espécies do gênero *Astyanax*, destacando

seus grupos ontogenéticos. Diagramas de variação corporal do tipo ‘outline drawing’ para cada variação final dos eixos das componentes 1 (PC1+; PC1-) e 2 (PC2+; PC2-).

Já na CVA, contabilizando a informação a priori de agrupamentos dos espécimes, as variações corporais entre espécies e grupos ontogenéticos formaram quatro agrupamentos diferentes estatisticamente (Figura 6, Tabela III). Os dois primeiros eixos da CVA somaram 94,15% sendo, no eixo 1 a variação corporal representando diferenças entre espécies (81,60%) e no eixo 2 representando a variação ontogenética (12,54%). O teste de permutação da distância de Procrustes entre os grupos indicou diferença estatística, sendo a diferença entre grupos ontogenéticos maior que a diferença entre espécies (Tabela III). Com relação aos deslocamentos vetoriais dos marcos anatômicos, *A. fasciatus* apresentou uma constrição nos marcos anatômicos da cauda, um estiramento da base da nadadeira caudal e um leve arqueamento do landmark da ponta do focinho. No sentido oposto do eixo 1, a forma corporal observada é fortemente ligada a *A. scabripinnis*, apresentando um corpo mais robusto na parte anterior do corpo, base da nadadeira caudal mais restrita, menor arqueamento do marco anatômico do focinho e um corpo mais baixo nos indivíduos adultos (Figura 6).

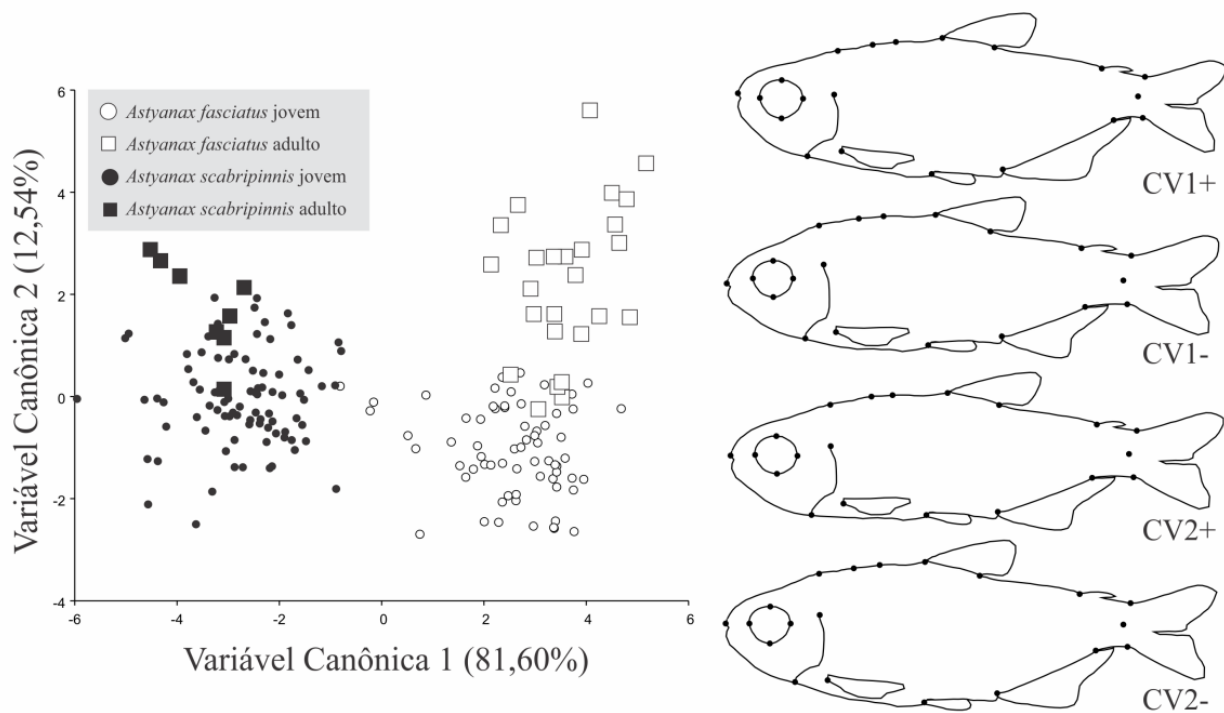


Figura 6 – Análise de variáveis canônicas de duas espécies do gênero *Astyanax*, destacando seus grupos ontogenéticos. Diagramas de variação corporal do tipo ‘outline drawing’ para cada variação final dos eixos das canônicas 1 (CV1+; CV1-) e 2 (CV2+; CV2-).

Tabela III – Estatística da CVA e teste de permutações entre as distâncias de Procrustes dos grupos ontogenéticos de cada espécie de *Astyanax*. CV – Eixos das variáveis canônicas, %Var – Porcentagem de variância dos dados, %CumVar – Porcentagem cumulativa de variância dos dados. fas – *A. fasciatus*, sca – *scabripinnis*, J – jovem, A – Adulto. Valores destacados de negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Variáveis canônicas				Distância de Procrustes entre grupos			
CVs	Autovalores	%Var	%CumVar	fas/A	fas/J	sca/A	
1	8,29	81,604	81,604	fas/J	0,0191		
2	1,27	12,545	94,149	sca/A	0,0471	0,0459	
3	0,59	5,851	100,000	sca/J	0,0305	0,0271	0,0270

No sentido do eixo 2 da CVA, os destaques de variação de forma foram relacionados a variação ontogenética de Jovem (CV2-) para Adultos (CV2+). De maneira geral, jovens apresentaram a forma corporal mais robusta do que a observada na tendência para os adultos (Figura 6).

Na DFA entre espécies foi observada diferença significativa e a porcentagem de classificação correta foi de mais de 95% para cada espécie (tabela IV). As diferenças de deslocamento vetorial foram nos marcos anatômicos caudais e das nadadeiras ventral e a anal (Figura 7).

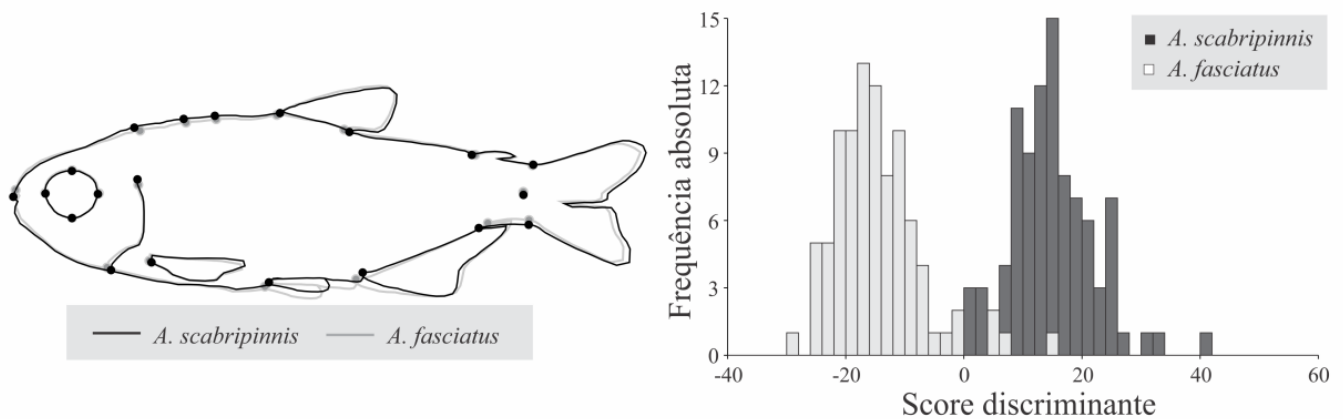


Figura 7 – *Outline drawing* da comparação de forma corporal entre espécies a partir dos scores da análise de função discriminante.

Na DFA, comparando os estágios ontogenéticos separadamente por espécie, a diferença de forma foi maior na espécie *A. scabripinnis* (distância de Procrustes = 0,02) em relação a *A. fasciatus* (distância de Procrustes = 0,01). Nas matrizes de validação cruzada, *A. scabripinnis* apresentou valores de cerca de 75% para jovens e 96% para adultos, enquanto para *A. fasciatus* esses valores foram em torno de 85 a 87% (tabela IV). Na variação de forma, em cada espécie houve uma variação ontogenética nos marcos anatômicos da região ventral enquanto, somente para *A. scabripinnis* os marcos anatômicos da região do focinho apresentaram variação (Figura 8).

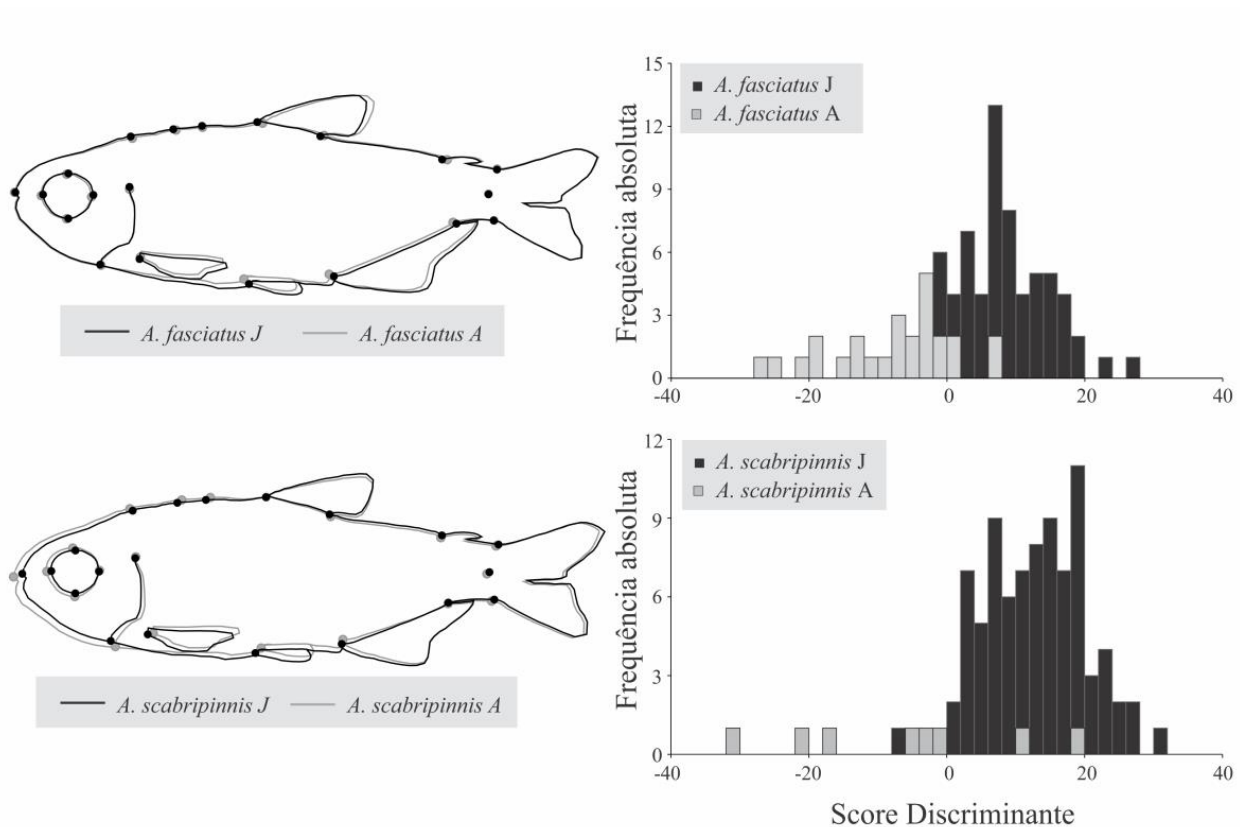


Figura 8 – *Outline drawing* da comparação de forma corporal ontogenética, separadamente para cada espécie, a partir dos scores da análise de função discriminante.

Na comparação de forma na DFA por Espécies vs. Ontogenia, a maior diferença de forma média foi entre os adultos de ambas as espécies (distância de Procrustes = 0,04) e, entre o jovem de *A. fasciatus* e o adulto de *A. scabripinnis* (distância de Procrustes = 0,045). A menor distância foi entre os jovens de ambas as espécies (distância de Procrustes = 0,027). Os resultados da matriz de classificação mantiveram o padrão observado nos resultados da distância de Procrustes com os jovens com cerca de 90-95% de classificação correta enquanto, na comparação entre os adultos de ambas as espécies foi de 100% de classificação (tabela IV). Jovens se discriminaram, na variação de forma, principalmente nos marcos anatômicos da nadadeira anal e levemente na nadadeira caudal e na região dorsal anterior, enquanto os adultos se discriminaram em

quase todos os marcos anatômicos com maior deslocamento vetorial na região dorsal anterior, focinho e cauda (Figura 9).

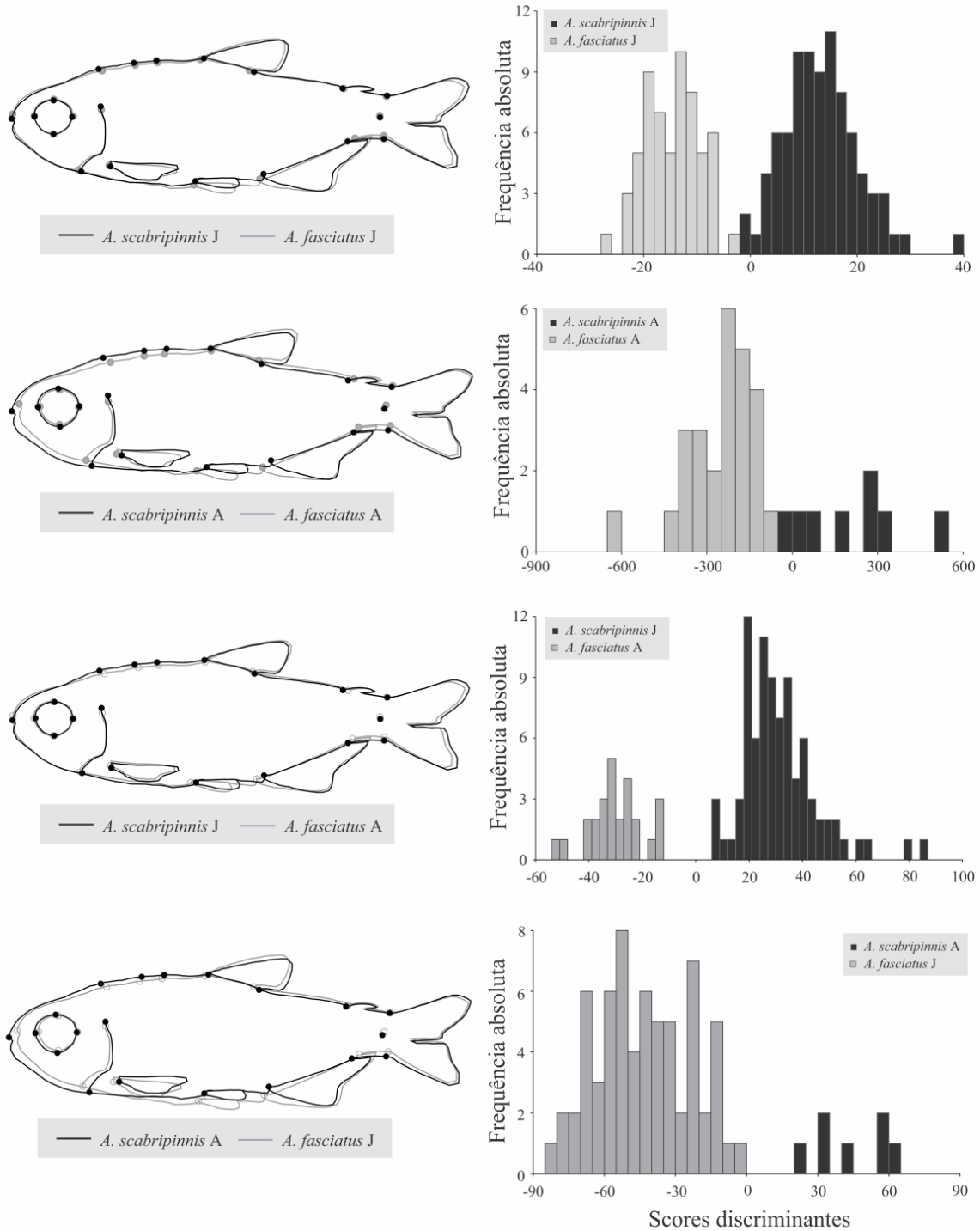


Figura 9 – *Outline drawing* da comparação de forma corporal Espécies vs. Ontogenia, a partir dos scores da análise de função discriminante.

Tabela IV - Matrizes de validação cruzada da Análise de função discriminante em diversos fatores (Espécies, Ontogenia e Espécies vs. Ontogenia).

fas – *A. fasciatus*, sca – *scabripinnis*, J – jovem, A – Adulto.

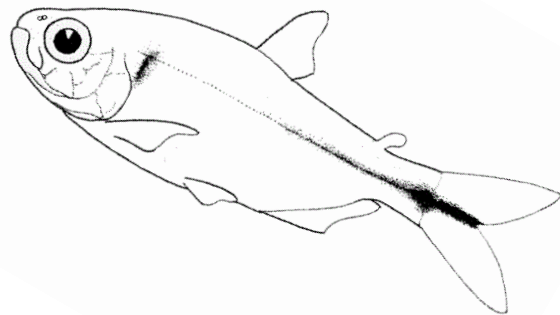
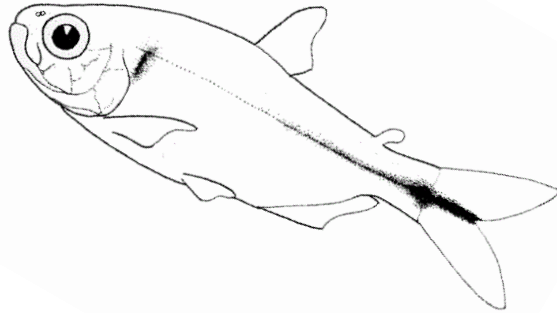
<i>A. fasciatus</i> vs. <i>A. scabripinnis</i> Espécie					<i>A. fasciatus</i> Jovem vs. Adulto				
	A. fas	A. sca	Total	(%)		A. fas A	A. fas J	Total	(%)
A. faz	88	4	92	95.65%	A. fas Adulto	22	4	26	84.62%
A. sca	0	94	94	100.00%	A. fas Jovem	8	58	66	87.88%

<i>A. scabripinnis</i> Jovem vs. Adulto					<i>A. fasciatus</i> vs. <i>A. scabripinnis</i> Jovem				
	A. sca	A. sca	Total	(%)		A. fas J	A. sca J	Total	(%)
A. sca Adulto	6	2	8	75.00%	A. fas Jovem	62	4	66	93.94%
A. sca Jovem	3	83	86	96.51%	A. sca Jovem	2	84	86	97.67%

<i>A. fasciatus</i> vs. <i>A. scabripinnis</i> Adulto					<i>A. fas</i> Adulto vs. <i>A. sca</i> Jovem				
	A. fas	A. sca	Total	(%)		A. faz	A. sca	Total	(%)
A. fas Adulto	26	0	26	100.00%	A. fas Adulto	26	0	26	100.00%
A. sca Jovem	1	7	8	87.50%	A. sca Jovem	0	86	86	100.00%

<i>A. fas</i> Jovem vs. <i>A. sca</i> Adulto				
	A. fas J	A. sca	Total	(%)
A. fas Jovem	66	0	66	
A. sca Adulto	1	7	8	

DISCUSSÃO



Apesar de muitos estudos, ainda pouco se sabe sobre as relações dentre alguns membros de Characidae, sendo *Astyanax* um dos gêneros com lacunas a serem preenchidas. Com base na morfologia, Mirande (2010) mostrou que o gênero é polifilético. Este fato, juntamente com problemas de identificação das espécies do gênero e o número incerto de espécies fazem com que novos estudos sejam necessários.

A identificação de espécies por métodos moleculares ocorre desde a década de 60 (Cowie, 1968). Recentemente, está sendo mais utilizada, como por exemplo a proposta de Hebert et al. (2003) que, com o objetivo de facilitar a identificação de espécies, desenvolveram o sistema de identificação biológica baseado em sequências de DNA. Assim, uma região do genoma foi sugerida para diferenciar os animais, o gene da citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1 ou COI).

Apesar disso, é conhecida a considerável diversidade morfológica dentre os Characiformes, já que o grupo passou por grande divergência evolutiva (Greenwood et al. 1966). Por essa razão, estudos como este, que utilizam métodos de morfometria geométrica, e estudos que comparam métodos são necessários para um melhor entendimento da relação e forma do corpo das espécies.

Em 1921, Eigenmann relata que algumas espécies do gênero *Astyanax*, entre elas *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*, quando coletadas em um mesmo rio possuem fácil distinção. Fato que também foi verificado em coletas realizadas, por exemplo, na região de Botucatu/SP (Rios Alambari, Araquá e Córrego Cascatinha) e Minas Gerais (Rios Muzambinho e São Domingos) (comunicação pessoal*). As espécies analisadas no presente estudo fazem parte, na verdade, de complexos de espécies (complexos *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis*) que são geneticamente muito similares, o que poderia indicar a existência de uma única espécie (*sensu* Rossini & Oliveira, em

preparação), apesar de suas notáveis diferenças morfológicas. Utilizou-se, portanto, um método morfométrico para avaliar e quantificar as diferenças entre as espécies e seus grupos ontogenéticos.

Sabe-se que o objetivo da morfometria é quantificar o tamanho e a forma dos organismos com o auxílio, por exemplo, dos métodos estatísticos. Alguns estudos, como os de Liu et al. (1996) e Laurie et al. (1997), utilizaram métodos morfométricos para analisar o contorno de uma parte de um determinado animal (*Drosophila* sp). Com o uso de métodos tradicionais de morfometria, normalmente são verificados problemas relacionados com a variação no padrão da forma. Com o uso de métodos que utilizam pacotes estatísticos e uma abordagem multivariada, é possível uma melhor avaliação da variação integrada do organismo e comparações de formas e estruturas direcionadas ao estudo da sistemática (Neff & Marcus, 1980; Reis, 1988; Rohlf, 1990). Com o emprego da morfometria geométrica, utilizam-se dados geométricos da estrutura morfológica e estatísticas multivariadas com métodos de visualização direta na forma biológica (Adams et al. 2004). O presente estudo, portanto, utilizou o método de morfometria geométrica para testar se as espécies pertencentes aos complexos *Astyanax fasciatus* e *A. scabripinnis* apresentariam, em algum nível, semelhanças morfométricas nos diferentes estágios do desenvolvimento, podendo a grande diferenciação morfológica observada ser resultado das diferentes características ambientais a que essas espécies estão sujeitas.

Alguns pesquisadores já vêm utilizando a morfometria geométrica como método em seus estudos taxonômicos, como por exemplo, Klingenberg & Marugán-Lobon (2013), que, através da morfometria geométrica, compararam e exploraram o crânio de aves em um cenário evolutivo. Já, Sidlauskas et al. (2011), em seu estudo, afirmam que de forma alguma o método linear deve ser “condenado”, pois apresentam

suas vantagens. Uma delas é que, na abordagem tradicional, espécimes dobrados ou curvados podem ser utilizados, desde que seja possível medi-los. Já para as análises de morfometria geométrica isso não ocorre, pois os espécimes não podem ser fotografados ou radiografados se estiverem curvados, por exemplo, o que com certeza prejudicaria os resultados finais. Esse fato foi verificado no presente estudo, pois nem todos os espécimes contidos nos lotes da coleção zoológica estavam em condições para serem utilizados nas análises (episódio que não interferiu no resultado). A pesquisa de Sidlauskas et al. (2011), abrangeu as abordagens linear e geométrica para separar espécies do gênero *Leporinus*. Os autores chegaram à conclusão que, neste caso, o método geométrico é mais robusto do que o método linear tradicional.

A medição tradicional destinada à obtenção de caracteres morfométricos não levam em consideração, por exemplo, o que ocorre naturalmente nos indivíduos, como a variação alométrica e os diferentes estágios de crescimento, provocando erro nas análises e não representando a real forma dos organismos (Bemvenuti & Rodrigues, 2002). No presente estudo utilizou-se uma abordagem estatística controlando os efeitos alométricos (correção alométrica, proposta por Sidlauskas et al. 2011 e Alencar et al. 2014), potencializando a comparação e variação de formas entre as espécies. É possível afirmar que, em relação à forma do corpo, as espécies aqui analisadas são diferentes. São diferentes quando comparadas entre si e uma maior diferença foi verificada quando os grupos ontogenéticos foram comparados. Tanto os jovens e adultos dentro da mesma espécie, como os jovens e os adultos de *A. fasciatus* quando comparados com os de *A. scabripinnis* possuem formas diferentes.

Em relação às diferenças encontradas quando os marcos anatômicos de ambas as espécies foram comparados, o resultado do presente estudo corrobora com o que é verificado na literatura. O corpo mais robusto na região anterior de *A. scabripinnis*

também foi verificado por outros autores, inclusive para limitar o número de espécies do complexo (Bertaco & Lucena, 2006). O corpo mais robusto de *A. scabripinnis* foi citado como uma das características diagnósticas desde 1921 (e 1926), por Eigenmann. Apesar de muitas espécies do gênero *Astyanax* sejam capazes de colonizar diferentes habitats (Esteves & Galetti 1995, Hahn et al. 1998, Vilella et al. 2002, Orsi et al. 2004), o formato do corpo de *A. scabripinnis* pode ser relacionado com o ambiente em que normalmente são encontrados, como rios de correntezas moderadas (Abilhoa, 2007) e em riachos localizados nas cabeceiras em locais com forte correnteza (Vieira et al. 2005). Normalmente, nesses ambientes são encontrados peixes com um formato do corpo fusiforme e mais baixo, para a redução do gasto de energia e produzir natação prolongada, o que confirma os resultados aqui encontrados para *A. scabripinnis*. No entanto, *A. fasciatus*, que normalmente é encontrado em ambientes lênticos (Gonçalves & Alves, 2008), apresenta o formato do corpo generalizado, o que foi confirmado pelas análises aqui apresentadas. Este formato de corpo está relacionado a nadadores ativos em ambientes mais lênticos.

O estudo de Sidlauskas et al. (2006), utilizando análises morfométricas mostra que uma espécie de Characidae, *Bryconops sp. cf. melanurus*, coletadas em ambientes diferentes, apresentaram diferenciação fenotípica. É possível sim, que organismos da mesma espécie, quando localizados em diferentes ambientes ou expostos à diferentes fatores ambientais, possam apresentar fenótipos distintos (Gould & Johnston, 1972; Brett, 1979). Entre os fatores ambientais mais conhecidos, a variação de temperatura (Hubbs, 1922; Barlow, 1961; Beacham, 1990), velocidade da água (Claytor et al. 1991; McLaughlin & Grant, 1994; Imre et al. 2002) e a existência de micro habitats (Lundberg & Stager, 1985; Layser & Clady, 1987; O'Reilly & Horn, 2004), podem induzir a variação intraespecífica em peixes.

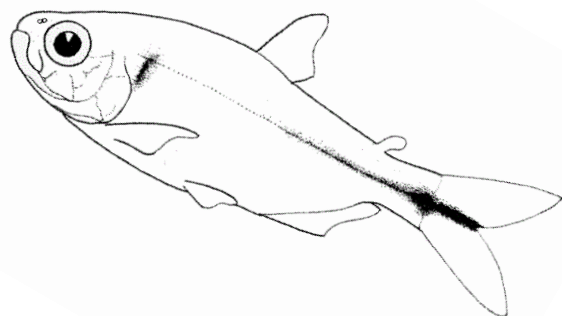
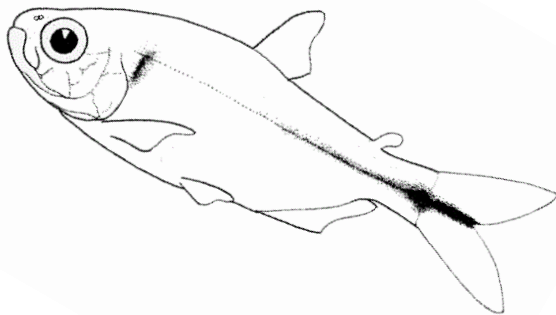
As espécies do presente estudo foram coletadas em locais diferentes e expostas à fatores ambientais diferentes, sendo esse um provável motivo da diversidade de forma verificada entre as espécies. De acordo com Moreira-Filho & Bertollo (1991), as espécies do complexo *A. scabripinnis* apresentam sutil diferenciação morfológica quando coletadas em diferentes bacias e comparadas entre si. Ou até mesmo podem apresentar plasticidade fenotípica e diferenciação morfológica quando verificadas na mesma bacia hidrográfica (Caramashi, 1986). Para *A. fasciatus*, evidências apontam que mesmo em regiões diferentes da mesma bacia, podem haver populações sofrendo pressões ambientais distintas influenciando diretamente nos aspectos fenotípicos, como comentam Medrado et al. (2008), em seu estudo.

Um estudo direcionado à uma espécie do gênero *Astyanax* (*A. bimaculatus*), utilizando marcos anatômicos e análises morfométricas, mostrou que espécimes coletados em ambientes lóticos e lênticos apresentaram diferenciação morfológica (Santos & Araújo, 2014). Desse modo, diferenças nas formas dentro das mesmas espécies já são conhecidas. Fato que também foi verificado por Castro et. al. (2014), ao estudarem duas populações de *A. scabripinnis* isoladas por uma queda d'água de mais de 100 metros de altura e localizadas em diferentes altitudes do mesmo rio. Os autores afirmam a existência de diferença entre as populações a partir dos resultados de morfometria geométrica. A partir desse resultado e outras comparações (reprodução, cariótipo, morfologia dentária, e número de raios da nadadeira anal), existe a evidência de que ocorreu um processo de especiação incipiente, o que leva as duas populações de *A. scabripinnis* seguirem vias evolutivas independentes. O presente estudo afirma que existem diferenças morfológicas suficientes entre as espécies e os grupos ontogenéticos dos complexos *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*, para questionar a existência de uma única espécie.

Estudos morfométricos como este são relevantes para o entendimento sobre questões evolutivas de populações. No entanto, para uma maior segurança ao afirmar que as espécies de ambos os complexos sejam a mesma, faz-se necessário a associação de diversos métodos. Reforça-se, assim, a afirmativa de que a ideia de *DNA Barcode*, através da análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I deve ser empregado apenas como mais uma evidência e/ou caráter na identificação e proposição de novas espécies em peixes caracídeos. A utilização conjunta de dados genéticos e morfológicos pode contribuir muito mais para a taxonomia animal (Will et al. 2005) do que apenas o emprego de um ou outro método de forma isolada, já que tanto a morfologia como a genética, são complementares e constituem fontes independentes de evidência (Bueno-Silva, 2012).

As espécies do presente estudo podem ser geneticamente próximas, mas as características diagnósticas facilmente verificadas na literatura e os resultados aqui apresentados apontam para o fato de que, ambas possuem a forma do corpo diferente desde quando são consideradas jovens. Assim, embora extremamente similares geneticamente, ambas as espécies acumularam, num provável curto espaço de tempo, um alto grau de diferenciação morfológica que as incapacita de se reconhecerem como uma única espécie.

REFERÊNCIAS



Abilhoa, V. 2007. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 24(4): 997-1005.

Adams, D. C., Rohlf, F. J., Slice, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*, 71:5-16. 2004.

Albrecht, G. H. 1980. Multivariate analysis and the study of form, with special reference to canonical variate analysis. *American Zoologist*. 20: 679-693.

Alencar, C. E. R. D., Lima-Filho, P. A., Molina W. F. e Freire, F. A. M. 2014. Sexual shape dimorphism of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda, Ucididae) accessed through geometric morphometric. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2014/206168.

Barlow, G.W. 1961. Causes and significance of morphological variation in fishes. *Systematic Zoology*. 10: 105–117.

Beacham, T. D. 1990. A genetic analysis of meristic and morphometric variation in chum salmon (*Onchorhynchus keta*) at three different temperatures. *Canadian Journal of Zoology*. 68: 225–229.

Bemvenuti, M. A., Rodrigues, F. L. 2002. Análise comparativa entre técnicas morfométricas aplicadas a *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) e *Odontesthes humensis De Buen* (Osteichthyes, Atherinopsidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba. 19(3): 789-796.

Bertaco, V. A. & Lucena, C. A. S. 2006. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*. 4(1): 53-60.

Brett, J. R. 1979. Environmental factors and growth. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish physiology*, vol 8. Academic Press, New York. p. 599–675.

Britski, H. H., Sato, Y., Rosa, A. B. S. 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF. p. 105.

Britski, H. A., Silimon, K. Z., Lopes, B. S. 1999. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Embrapa-SPI, Corumbá, Embrapa-CPAP, Brasília, Brasil.

Buckup, P. A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). Pp. 123-144. In: Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M., Lucena, C. A. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre. p. 603.

Buckup, P. A. 2007. Triportheinae. In Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Edited by Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 43-44.

Bueno-Silva, M. 2012. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade. 34(83): 157-163.

Caramaschi, E. M. P. 1986. Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, S. A., Leal, C. G., Oliveira, C., Hanner, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. Mitochondrial DNA. 22: 80-86.

Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O. A., Santos, M. H., Nogaroto, V., Vicari, M. R., Almeida, M. C., Artoni, R. F. 2014. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). Neotropical Ichthyology, 12(2): 429-438.

Chao, L. N., Petry, P., Prang, G., Sonneschien, L., Tlusty, M. 2001. Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonia, Brazil. Manaus, Editora da Universidade do Amazonas. p.310.

Clayton, R. R., MacGrimmon, H. R., Gots, B.L. 1991. Continental and ecological variance components of European and North American Atlantic salmon (*Salmo salar*) phenotypes. *Biological Journal of the Linnean Society*. 44: 203–229.

Dryden, I. L., Mardia, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. Wiley, New York.

Cock, A. G. 1966. Genetical aspects of metrical growth and form in animals. *Quarterly Review of Biology*, 41: 131-190.

Cowie, W. P., 1968. Identification of fish species by thin-slab polyacrylamide gel electrophoresis of the muscle myogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 19(4): 226-229.

Cureton, II, J. C & Broughton, R. E. 2014. Rapid morphological divergence of a stream fish in response to changes in water flow. *Biology Letters*. 10: 20140352.

Drake, A. G. & Klingenberg, C. P. 2008. The pace of morphological change: Historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences*, 275: 71-76.

Dryden, I. L. & Mardia, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. Wiley, Chichester, England.

Eigenmann, C. H. 1921. The American Characidae. *Memoirs Museum of Comparative Zoology*. 43(3): 209-310.

Eigenmann, C. H. 1927. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*. 43(4): 311-428.

Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2010. Species of fishes by family/subfamily. Onlineversion:<http://research.calacademt.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>.

Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2014. Species by family/subfamily. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Eletronic version accessed 01 June 2014.

Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2015. Species by family/subfamily. In: Eschmeyer, W. N. (Ed.). Catalog of fishes. California, California Academy of Sciences. Onlineversion.vailablefrom:<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

Esteves, K. E. & Galetti, P. M. 1995. Food partitioning among characids of a small brazilian floodplain lake from the Paraná river basin. *Enviromental Biology of Fishes*. 42: 375-389.

Franssen, N. R. 2011. Anthropogenic habitat alteration induces rapid morphological divergence in a native stream fish. *Evolutionary Applications*. 4: 791-804.

Froese, R. & Pauly, D. (eds.) 2014. Fish Base, World Wide Web electronic publication: www.fishbase.org, ver. Accessed April 2014.

Garutti, V. & Britski, H. A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia, Porto Alegre*. 13: 65-88.

Gayet, M. 1981. Contribution à l'étude anatomique et systématique de l'ichthyofaune cénomanniene du Portugal. II – Les osteriophysaires. *Com. Serv. Geol. Portugal*. 67: 173-190.

Géry, J. 1977. Characoids of the World. Neptune City: T.F.H. Publications. p. 672.

Gonçalves, C. S. & Braga, F. M. S. 2008. Fish diversity and occurrence in the influence area of the Mogi Guaçu reservoir and oxbow lakes, high Paraná river basin, São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*. 8(2): <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n2/pt/abstract?article+bn02008022008>.

Good, P. 2000. Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses. Springer, New York, NY, USA.

Goodall, C. R. 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*. 53: 285-339.

Gould, S. J., & Johnston, R. F. 1972. Geographic variation. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 3: 457–498.

Greenwood, P. H., Rosen, D. E., Weitzman, S. H., Myers, G. S. 1966. Phyletic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 131: 339-456.

Hahn, N. S., Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Bini, L. M. 1998. Estrutura trófica da ictiofauna do reservatório de Itaipu (Paraná-Brasil) nos primeiros anos de formação. *Interciência*. 23(5): 299-305.

Hass, T. C., Blum, M. J., Heins, D. C. 2010. Morphological responses of a stream fish to water impoundment. *Biology Letters*. 6: 803-806.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 270: 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., deWaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270: S96-S99.

Hubbs C. L. 1922. Variations in the number of vertebrae and other meristic characters of fishes correlated with the temperature of water during development. *The American Naturalist*. 56: 360–372.

Imre I., McLaughlin R. L., Noakes D. L. G. 2002. Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow. *Journal of Fish Biology*. 61: 1171–1181.

Jolliffe, I. T. 2002. *Principal Component Analysis*. SpringerVerlag, New York.

Kavalco K. F., Brandão, K. O., Pazza R., Almeida-Toledo, L. F. 2009. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? *Genetics and Molecular Biology*. 32: 477–483.

Klingenberg, C. P. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 11: 353-357.

Klingenberg, C. P. & McIntyre, G. S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*. 52: 1363-1375.

Klingenberg, C. P. & Monteiro, L. R. 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*. 54: 678-688.

Klingenberg, C., Duttke, S., Whelan, S., Kim, M. 2012. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of Evolutionary Biology*. 25: 115–129.

Klingenberg, C. P. & Marugan-Lobón, J. 2013. Evolutionary covariation in geometric morphometric data: Analyzing integration, modularity, and allometry in phylogenetic context. *Systematic Biology*. 62(4): 591-610.

Lara, A., León J. L. P., Rodriguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez, L., Machado, E. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*. 10: 421-430.

Lasso, C., Mojica, J.I., Usma, J.S., Maldonado-Ocampo, J.A., Nascimento, C., Taphorn, D.C., Provenzano, F., Lasso-Alcalá, Ó., Galvis, G., Vásquez, L., Lugo, M., MachadoAllison, A., Royero, R., Suárez, C., Ortega-Lara, A. 2004. Peces de la cuenca del río Orinoco. Parte I: Lista de especies y distribución por subcuencas. *Biota Colombiana* 5(2): 95-158.

Laurie, C. C., True, J. R., Liu, J., Mercer, J. M., 1997. An introgression analysis of quantitative trait loci that contribute to a morphological difference between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics*. 145: 339–348.

Layzer J. B. & Clady M. D. 1987. Phenotypic variation of young-of-year bluegills (*Lepomis macrochirus*) among microhabitats. *Copeia*. 1987: 702–707.

Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Silva, J. F. P., Vari, R. P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O. T., Pavanelli, C. S., Menezes, N. A., Lucena, C. A., Malabarba, M. C. S., Lucena, Z. M. S., Reis, R. E., Langeani, F., Casatti, L., Bertaco, V. A., Moreira, C., Lucinda, P. H. F. 2003. Generea Incertae sedis in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America/ Organized by R.E. Reis, S.O. Kullander e C. J. Ferraris Jr. Porto Alegre. EDIPUCRS. p.742.

Liu, J., Mercer, J. M., Stam, L. F., Gibson, G. C., Zeng, Z. B., Laurie, C. C., 1996. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics*. 142: 1129–1145.

Lucena, C. A. S. 1993. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostharophysi, Characiformes).

São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1993. 158p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas.

Lundberg, J. G., Stager, J. C. 1985. Microgeographic diversity in the neotropical knife-fish *Eigenmannia macrops* (Gymnotiformes, Sternopygidae). *Environmental Biology of Fishes* .13: 173–181.

Mabragana, E., Astarloa, J. M. D., Hanner, R., Zhang, J., Castro, M. G. 2011. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoSOne*, 6: e28655.

Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. S. (eds). 1998. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 603.

McLaughlin, R. L., Grant, J. W. A. 1994. Morphological and behavioral differences among recently-emerged brook char, *Salvelinus fontinalis*, foraging in slow- vs. fast-running water. *Environmental Biology of Fishes*. 39: 289–300.

Medrado, A. S., Figueiredo, A. V. A., Waldschmidt, A. M., Affonso, P. R. A. M., Carneiro, P. L. S. 2008. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology*. 31: 208-214.

Melo, F. A. G. 2001. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional*. 59: 1-46.

Melo, F. A. G. & Buckup, P. A. 2006. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*. 41(1): 45-52.

Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*. 8: 385-568.

Monteiro, L. R. 2013. Morphometrics and the comparative method: studying the evolution of biological shape. *Hystrix*. 24(1): 25-32.

Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*. 14: 331-357.

Neff, N. A. & Marcus, L. F. 1980. A survey of multivariate methods for systematics. Privately published, N.Y.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*, 4 th ed., Wiley New York, NY, US.

Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Maariguela, T. C., Benine, R.C., Ortí, G., Vari, R. P., Correa e Castro, R. M. 2011. Phylogeny relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 275.

O'Reilly, K. M., Horn, M.H. 2004. Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. *Journal of Fish Biology*. 64: 1117–1135.

Orsi, M. L., Carvalho, E. D., Foresti, F. 2004. Biologia populacional de *A. altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 21: 207-218.

Otero, O & Gayet, M. 2001. Palaeoichthyofaunas from the lower Oligocene and Miocene of the Arabian plate. Palaeocological and palaeobiogeographical implications. *Palaeogr., Palaeoclimat., Palaeoecol.* 165: 141-169.

Park, P. J., Windsor, Aguirre, W. E., Spikes, D. A., Miyazaki, J. M. 2013. Landmark-Based Geometric Morphometrics: What Fish Shapes Can Tell Us about

Fish Evolution. Tested Studies for Laboratory Teaching Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education. 34: 361-371.

Pazza, R., Kavalco, S. A. F., Penteado, P. R., Kavalco, K. F., Almeida-Toledo, L. F. 2008. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*.72: 2002-2010.

Pereira, L. H. C., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*. 14: 20.

Pie, M. R., Baggio, R. A., Boeger, W. A., Patella, L. A., Ostrensky, J. ., Vitule, J. R. S., Abilhoa, V. 2009. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguazu River. *Journal of Fish Biology*. 75: 2357-2362.

Reis, S. F. 1988. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. *Revista Brasileira de Zoologia*. 5(4): 571 - 580

Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), EDIPUCRS, Porto Alegre, p.729.

Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 1990. "Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of marcos anatômicos," *Systematic Zoology*. 39: 40-59.

Rohlf, F. J. 2006. TPSDIG2 for Windows version 2.10. Available from: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Accessed in July 20, 2008.

Rohlf, F. J. 2008. tpsUtil, file utility program. version 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Rossini, B. C. & Oliveira, C. (em preparação). Estudo da diversidade e das relações filogenéticas do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) baseado em sequências de DNA.

Santos, A. B. I. & Araújo, F. G. 2014. Evidence of morphological differences between *Astyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. *Environmental Biology of Fishes*. (online)

Sidlauskas, B. L. 2008. Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: a phylomorphospace approach. *Evolution* 62: 3135-3156.

Sidlauskas, B. L., Chernoff, B., Machado-Allison, A. 2006. Geographic and environmental variation in *Bryconops sp. cf. melanurus* (Ostariophysi: Characidae) from the Brazilian Pantanal. *Ichthyological Research*. 53: 24-33.

Sidlauskas, B. L., Mol, J.H., Vari, R. P. 2011. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriciformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 162: 103–130.

Vari, R. P. 1998. Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.

Vari, R. P., Ferraris Jr., C. J., Radosavljevic, A., Funk, V. A. 2009. Checklist of the freshwater fishes of the Guiana Shield. *Bulletin of the Biological Society of Washington*. 17: 1-95.

Vazzoler, A. E. A. M. & Menezes, N. A. 1992. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Revista Brasileira de Biologia*. 52 (4): 627-640.

Veregue, A. M. L. & Orsi, M. L. 2003. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes: Characidae) do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia*. 20(1): 97-105.

Vieira, F., Gomes, J. P. C., Maia, B. P., Silva, L. G. M. 2005. Peixes do Quadrilátero Ferrífero. Guia de Identificação. p.206.

Vilella, F. S., Becker, F. G., Hartz, S. M. 2002. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic forest river in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 45(2): 223-232.

Weitzman, S. H., & Vari, R. P. 1988. Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 101(2): 444-465.

Weitzman, S. H., Menezes, N. A., Evers, H. G., Burns, J. R. 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an an-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3(3): 329-360.

Will, K. W., Mishler, B. D., Wheeler, Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5): 844-851.

*Observação dos lotes contidos na coleção ictiológica (Laboratório de Biologia de Peixes - LBP), presentes no departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, campus de Botucatu/SP.