
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JACQUELINE WILLIK CORRÊA

**FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA
POPULACIONAL DE *Astyanax paranae*
(LAMBARI-DE-CABECEIRA)
(PISCES:CHARACIDAE) NA BACIA DO RIO
TIETÊ**



Rio Claro
2010

JACQUELINE WILLIK CORRÊA

FILOGEOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Astyanax paranae* (LAMBARI-DE-CABECEIRA) (PISCES: CHARACIDAE) NA BACIA DO RIO TIETÊ

Orientador: Dr. Anderson Luís Alves

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

Rio Claro
2010

597 Corrêa, Jacqueline Willik
C824f Filogeografia e estrutura populacional de *Astyanax*
 paranae (lambari-de-cabeceira) (Pisces: Characidae) na Bacia
 do Rio Tietê / Jacqueline Willik Corrêa. - Rio Claro : [s.n.],
 2010
 54 f. : il., figs., tabs.

 Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
 bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
 Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Anderson Luís Alves

 1. Peixe. 2. Citocromo B. 3. Insertae sedis. I. Título.

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

Obrigada pai, mãe e Érica (minha irmã), pela casa, comida e roupa lavada (sentido figurado, tipo barba, cabelo e bigode). Tia Marta! Pelas conversas e pelas canções. Lele e Tate por existirem.

Obrigada siriemas (Cris, Tibú, Mil, Curiosa, Larva e Gabi) pelo melhor ano de todos...

...por não me deixarem dormir até mais tarde (Fulô), pelos rangos “top”, pelas geléias de amora, pelas frases na parede da cozinha do tipo: “Mais bonito que eu só quiabo lustroso!” e neologismos da Tibú (“limpeza narinal”), pelas risadas até doer a barriga, pelo Ranking Siriemas, pelas conversas pós-balada no café-da-manhã, pelo amor imenso que eu tenho por todas vocês, por todos os aprendizados que me proporcionaram...

Gabi, obrigada por salvar minha vida eletroeletrônica. Cris, obrigada pelo exemplo e pelos corres do TCC. Larva, obrigada por ser tonta igual a mim. Curiosa, obrigada por me levar a todos os roles e baladas do universo. Tibú, obrigada pela sua doçura. Milhouse, obrigada pelas palhaçadas e pelas comidas deliciosas.

Obrigada Calabouço, Milharal, e todas as repúblicas amigas.

Obrigada INTERBIO por todas as insanidades jamais imagináveis pela minha mente.

Obrigada Anderson, meu orientador, por gostar de peixes e a todos os alunos do LGP, especialmente o Play Mobil e a Duda, por compartilhar os géis esquecidos no transiluminador, os PCRs evaporados pelo termociclador, os tecidos “antigos” que não continham mais DNA, as sequências ilegíveis, a última gota de água que ficou no *eppendorf* e a estufa não conseguiu secar, e o fenol que vazou no vórtex, mesmo com o parafilme.

Obrigada aos professores Reinaldo Bertini e Jairo Rueda pela ajuda com os milhões de anos.

Valeu pessoas!

Temos medo de tudo. De sentir, de falar, de fazer, de amar.

Temos medo do julgamento, e somos paralisados por ele.

Temos medo do mundo. Temos medo de nós mesmos.

- Mas e se...?

“- Mas e se...?” toma nossas mentes a toda hora.

E se não gostarem de mim? Do jeito que eu sou?

Medo! De ficarmos sozinhos.

Na sociedade que queremos

Seríamos quem somos, sem receios.

Lembrando que nós somos a sociedade

A sociedade nos impõe limites para que vivamos nela

E nós, temendo ser abandonados por ela

Aceitamos seus limites quando, na verdade, desejamos que eles não mais existam

Para que possamos ser livres...

Em sociedade.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. A Bacia do Rio Tietê.....	7
1.1.1. Formação da Bacia do Rio Paraná.....	7
1.1.2. Bacia do Rio Tietê.....	8
1.2. A Ictiofauna de riachos.....	9
1.3. Filogeografia e sistemática molecular em peixes neotropicais.....	11
1.4. DNA Mitocondrial.....	13
1.5. <i>Astyanax paranae</i> e sua relação com o complexo de espécies <i>Astyanax scabripinnis</i>	14
2. OBJETIVO.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Materiais.....	18
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Coleta.....	21
3.2.2. Extração de DNA.....	22
3.2.3. Amplificação de DNA.....	24
3.2.4. Limpeza do produto de PCR para o sequenciamento.....	25
3.2.5. Análise das sequências do gene <i>cyt b</i>	26
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Análise nucleotídica das sequências do gene <i>cyt b</i>	29
4.2. Análises filogenéticas das sequências.....	32
4.3. Distâncias entre as sequências e relógio molecular.....	37
4.4. Análise populacional.....	40
4.4.1. Distâncias.....	40
4.4.2. Filogeografia.....	41
5. DISCUSSÃO.....	45

5.1. Relações filogenéticas e história evolutiva de <i>Astyanax</i> sp. na Bacia do Rio Tietê.....	45
5.2. Análises populacionais e filogeografia comparativa de <i>Astyanax paranae</i> e demais espécies do gênero.....	46
6. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Bacia do Rio Tietê

1.1.1. Formação da Bacia do Rio Paraná

Entre o neo-Oligoceno e o Mioceno houve a formação de um paleoambiente lacustre na região do sudeste brasileiro no qual o sistema de drenagem do alto Rio Tietê conectava-se ao Rio Paraíba do Sul e juntos desaguavam no oceano (MALABARBA et al., 1998).

A formação do sistema de drenagem do Rio Paraná e sua evolução pleistocênica foram desencadeadas por interações entre o clima e movimentos tectônicos, que juntos moldaram o paleorrelevo, produzindo patamares escalonados aproximadamente planos, constituídos por depósitos aluviais (terraços) e a planície aluvial atual (STEVAUX, 1994; SOUZA FILHO e STEVAUX & SANTOS apud SOUZA, C. R. G. et al. 2005).

Stevaux e Stevaux & Santos apud Souza et al., (2005) inferem quatro principais eventos climáticos, que ocorreram durante o Pleistoceno superior (entre 126 mil e 11 mil e 500 anos atrás, aproximadamente) e Holoceno (de 11 mil e 500 anos atrás até o presente), que contribuíram significativamente para a evolução do Rio Paraná. O primeiro evento (40 mil a oito mil anos atrás) caracterizou-se por um clima seco, vegetação de savana e deposição de barras de areia e cascalho em um sistema fluvial. No segundo período houve uma mudança para clima úmido - a partir de aproximadamente oito mil anos atrás. Este período produziu uma forte alteração na hidrologia do sistema fluvial, proporcionando o aparecimento de uma planície de inundação. Entre 3 mil e 500 e 2 mil e 500 anos atrás se estabeleceu uma segunda fase seca que se caracterizou pela ocorrência de depósitos eólicos e pelo abandono de inúmeros canais. O quarto e atual período evolutivo do sistema aluvial desenvolve-se desde 2,5 mil anos atrás até hoje e se caracteriza pelo retrabalhamento dos antigos depósitos tanto no canal atual como na planície, formando ilhas e aprofundando o próprio canal.

A Bacia do Rio Paraná é a segunda maior área de drenagem da América do Sul, com cerca de 2,6 milhões de km². Estende-se por: Brasil (45,6%), Argentina (29,7%), Paraguai (13,2%), Bolívia (6,6%) e Uruguai (4,8%) (ORFEU e STEVAUX, 2002). O Rio Paraná, está entre os dez maiores do mundo, com uma descarga média anual de 18.000 m³/s e cerca de 200 x 10⁶ toneladas de carga sedimentar transportada todo ano. O Rio Paraná se estende por 2.738 km (3.965 km se considerar a cabeceira, na Serra da Mantiqueira) desde o encontro dos rios Grande e Parnaíba até a foz, próximo a Buenos Aires, na Argentina. Em território brasileiro ele percorre 813 km. O Rio Paraná no Brasil hoje está quase totalmente inundado pelas barragens de Itaipu, Porto Primavera, Jupia e Ilha Solteira, restando apenas um trecho de 255 km entre o final do Lago de Itaipu e a Barragem de Porto Primavera aonde o rio apresenta-se nas condições naturais.

A principal drenagem da Bacia do Paraná é o próprio Rio Paraná, seguido pelos tributários Parnaíba e Grande (à montante), Tietê, Paranapanema, Ivaí, Piquiri e Iguazú (na margem esquerda), e os rios Ivinheima e Verde (margem direita).

1.1.2. Bacia do Rio Tietê

Na área de drenagem da Bacia do Rio Tietê o reverso da cuesta foi intensamente esculpido pela drenagem antiga, que chegou a dividi-lo em numerosos planaltos tabulares mais ou menos isolados de contornos arredondados e menores morros testemunhos de perfis incomuns (ALMEIDA apud ESPINDOLA, 1979). Essas formas recebem denominações locais: serras de Itaqueri, de São Pedro, de Botucatu, etc. Sobre os maiores relevos, campos arenosos da Formação Itaqueri recobrem os basaltos. O Rio Tietê alcança os derrames basálticos a aproximadamente 15 quilômetros acima de Barra Bonita, e para tal funil convergem as escarpas marginais, as “serras” de Botucatu, São Pedro e do Tabuleiro, perdendo altura e suavizando-se, para se transformarem no relevo de campos ondulados da vasta área de terra roxa que o Tietê drena a partir dali, aonde se situam Jaú, Pederneiras, Igarapu, Bariri, etc. Embora em diversas extensões do planalto de reverso da cuesta ocorram amplos restos da primitiva cobertura cretácea, o entalhe profundo ocorrido entre os rios Pardo e Mogi-Guaçu causou a sua total destruição, pelo que desenvolveu-se vasta área de terra roxa.

O Rio Tietê nasce no município de Salesópolis, a 840 m de altitude, nos contrafortes ocidentais da Serra do Mar, no Estado de São Paulo. De lá dirige-se para o noroeste

percorrendo todo o território paulista por uma extensão de 1.050 km, afluindo no Rio Paraná (ALMEIDA, PONÇANO e ROCHA apud BARRELLA, 1997).

Segundo Barrella (1997) o clima é influenciado tanto pela posição geográfica, como pela configuração do relevo. As cabeceiras, localizadas nas elevadas porções ocidentais da Serra do Mar, recebem fortes influências do dinâmico sistema de circulação de massas de ar continentais e oceânicas, produzindo um clima temperado, mais frio e úmido. À medida que se afasta das cabeceiras, há um aumento na temperatura e uma diminuição na quantidade de chuvas, produzindo zonas com clima subtropical de altitude úmido, subtropical de altitude seco e, finalmente, tropical quente com uma época seca bem pronunciada. Durante os meses de janeiro e fevereiro, ocorrem os picos de cheia, enquanto que em julho e agosto ocorrem as menores vazões médias.

Na porção das cabeceiras dos rios a vegetação é representada pela Floresta Atlântica (ombrófilas densas e mistas), na porção média encontram-se áreas cobertas por cerrados e nos trechos finais encontra-se a Floresta Estacional Semidecídua (mata mesófila ou de planalto) (CÂMARA apud BARRELLA, 1997).

O Tietê pode ser considerado o rio que recebe a maior carga poluidora da América Latina. Isso ocorre devido ao baixo índice de tratamento de esgotos sanitários e efluentes industriais da região mais populosa e desenvolvida do país (BARRELLA, 1997). O padrão de distribuição espacial e temporal das suas espécies de peixes, além de ser desconhecido, pode apresentar-se modificado devido a perturbações às quais está sujeito. Além disso, as diferenças entre as características primitivas e atuais das comunidades de peixes do Rio Tietê, não podem ser avaliadas diretamente, pois faltam informações confiáveis sobre a composição da ictiofauna e a abundância de suas espécies nos períodos anteriores às perturbações (BRITSKI, apud BARRELLA, 1997).

1.2. A Ictiofauna de Riachos

A água cobre dois terços do nosso planeta e a grande maioria dos ambientes aquáticos fornece suporte para a vida dos peixes, que correspondem à cerca de 50% dos vertebrados (NELSON, 2006). Os peixes apresentam uma considerável capacidade de adaptação biológica a diversos tipos de habitat, com grande variedade ambiental, espacial e temporal. Neste processo podemos observar as mais impressionantes especializações de morfologia, fisiologia

e comportamento (PURDOM, 1993). Porém, o impacto crescente que vem sendo gerado de diversos modos sobre o ambiente aquático, evidenciado principalmente pela poluição química, pela construção de barragens e pela pesca excessiva, tem aumentado a pressão sobre estes organismos.

Segundo Barrella (1997), o crescimento populacional dos municípios e o desenvolvimento econômico da região localizada dentro de uma bacia hidrográfica, incentivam atividades humanas que interferem direta ou indiretamente nas condições naturais das bacias. Dentre outras destacam-se a destruição de habitats e ecótonos (região de transição entre dois ecossistemas), a retirada das matas ciliares, o reflorestamento com plantas exóticas, a urbanização, a industrialização, a agricultura, a construção de aterros, o represamento, a canalização dos rios e o lançamento de efluentes sem tratamento. O resultado destas alterações ambientais é a diminuição do número de indivíduos e do número das espécies da fauna nativa (MOYLE; COURTENAY apud BARRELLA, 1997 e BAIN et al., 1988). Isto acontece porque poucas espécies nativas apresentam pré-adaptações às novas condições ambientais (FERNANDO e HOLCIK, 1991).

A construção de barragens para geração de energia, por exemplo, fragmenta as populações e impede a sua migração ao longo do rio, o que faz com que o fluxo gênico existente anterior à presença da barragem seja interrompido, isolando as populações (MORITA, K.; YAMAMOTO; MORITA, S. H., 2009). Desta forma os cruzamentos endogâmicos aumentam, o que diminui a variabilidade genética da população, aumentando seu risco de extinção.

É nesse sentido que o conhecimento detalhado dos aspectos da biologia e da genética dos peixes se torna indispensável para o manejo racional dos estoques pesqueiros e para a conservação de peixes de pequeno porte, a chamada ictiofauna de riachos.

De acordo com Castro e seus colaboradores (2003 e 2005) o estudo da sistemática, da evolução e da ecologia das espécies de pequeno porte é o maior desafio da ictiologia neotropical do século 21. Apesar dos esforços se conhece muito pouco sobre esta ictiofauna. Nas sub-bacias de drenagem do Alto Rio Paraná no Estado de São Paulo, por exemplo, cerca de 70% dos riachos não tinham sido explorados satisfatoriamente em termos científicos em 2003 (CASTRO et al., 2003, 2004). Este fato motivou 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. Recentemente foram identificadas seis novas espécies para a Bacia do Rio Tietê além de várias caracterizadas com

status taxonômico indeterminado, principalmente no gênero *Astyanax* (CASTRO et al, 2003, 2004, 2005).

Cinquenta por cento do total de espécies de peixes de água doce descritas para a América do Sul são representados por peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15cm de comprimento, que habitam principalmente riachos e cabeceiras (CASTRO et al., 2003). Por isso apresentam distribuição geográfica restrita e pouco ou nenhum valor comercial. Estas espécies dependem da vegetação ripária para a alimentação, abrigo e reprodução, por isso são ameaçadas por atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas associados a atividades agrícolas intensivas (CASTRO et al., 2003, 2005). Nesse sentido, de acordo com Castro et al. (2005), as pesquisas na ictiofauna de riachos são necessárias e urgentes.

A partir destas informações emerge a necessidade de estudos genético-moleculares enfocando aspectos filogeográficos e filogenéticos para peixes de riachos. Estes estudos são importantes ferramentas para a identificação molecular de novas espécies numa área de reconhecidos endemismo e subestimativa da ictiofauna.

1.3. Filogeografia e Sistemática Molecular em Peixes Neotropicais

Em 1987, Avise e seus colaboradores, ao observarem que sequências individuais (haplótipos) de DNA mitocondrial (mtDNA) de populações de muitas espécies possuíam localização geográfica específica, propôs o termo Filogeografia, passando a considerar os aspectos filogenéticos na estrutura das populações. Levando em conta a distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e o quanto eles se divergiam entre si, Avise propôs, em 2000, cinco categorias filogeográficas, considerando as divergências entre os haplótipos em populações simpátricas (ocupam a mesma região geográfica) e alopátricas (vivem em locais distintos).

Na categoria I, incluem-se as populações com alto grau de divergência (maior do que 1%) entre os haplótipos que são alopátricas. A categoria II abrange populações com haplótipos divergentes em simpatria. A categoria III inclui populações com haplótipo pouco divergentes (menos de 1%) e alopátricas. Na categoria IV estão as populações com baixa divergência entre seus haplótipos (ou até mesmo sem divergência entre eles) e em simpatria,

com ampla área de distribuição. Na quinta e última categoria estão as populações com haplótipos pouco divergentes e distribuição geográfica parcial, sendo uma categoria intermediária entre as categorias III e IV.

A repetição do mesmo haplótipo de mtDNA em diferentes populações revela a existência de fluxo gênico entre elas (ao menos via materna), ou então o recente surgimento de barreiras geográficas entre as populações. Divergências genéticas mais profundas indicam que a separação entre as populações é mais antiga (AVISE, 2000).

Das 48 espécies de peixe de água doce estudadas por Avise (2000) nenhuma da Região Neotropical (América do Sul e América Central) havia sido analisada em termos filogeográficos. Nos últimos sete anos porém, houve uma mudança neste cenário: atualmente cerca de 60 espécies de peixes de água doce desta região apresentam dados disponíveis sobre filogeografia molecular (ALVES et al., 2007, submetido). Entre estes estudos destaca-se o estudo filogeográfico de *Prochilodus lineatus* (Curimbatá) nos principais rios da América do Sul (SIVASUNDAR et al., 2001). Este estudo revelou alto nível de divergência entre os haplótipos amostrados na Bacia do Rio Paraná, possibilitando a identificação de subpopulações (haplótipos divergentes em simpatria) nos rios da Plata e Uruguai.

Strecker e colaboradores (2004) trabalharam com populações de espécies do gênero *Astyanax* na América Central e do Norte. Seus resultados sugeriram que a baixa divergência genética revelada entre os grupos não é compatível com a taxonômica atual, propondo que as espécies encontradas nesta região devam constituir uma simples unidade taxonômica, *Astyanax fasciatus*.

Em 2002, Perdices e colaboradores apresentaram um extenso trabalho no gênero *Rhamdia* na América Central. Os resultados revelaram que *Rhamdia nicaraguensis* é sinônimo de *R. laticauda* e os autores sugerem dois clados para a América Central, *R. guatemalensis* e *R. laticuada* 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 e Grezzelli (2003). Para testar esta hipótese filogeográfica de *Rhamdia quelen*, Alves et al. (2007, submetido) analisaram populações desta espécie ao longo das bacias: da Plata, Amazônica, Orinoco e Essequibo na América do Sul, e além de confirmar que *Rhamdia quelen* não está presente na América Central e na porção trans-andina da América do Sul, os autores observaram (na região cis-andina da América do Sul) 11 linhagens mitocondriais distintas, sugerindo ainda nesta região a ocorrência de um complexo de espécies, principalmente nas bacias dos rios costeiros e do Alto Rio Paraná.

Considerando-se as cerca de 4500 espécies de peixes de água doce descritas para a Região Neotropical, de acordo com Reis et al. (2003) o número de espécies analisadas filogeograficamente ainda é pequeno, apesar de ter crescido nos últimos anos (DERGAN et al., 2002; MONTOYA-BURGOS, 2003; BATISTA e ALVES-GOMES, 2006; WILLIS et al., 2007; HUBERT et al., 2007; entre outros). Os trabalhos realizados que se utilizaram de dados moleculares para interpretar a história filogenética de peixes neotropicais, embora poucos, mostraram que a taxonomia dos peixes de água doce dessa região pode se equivocar no que diz respeito a relacionamentos ao nível de espécie (PERDICES et al., 2002). Já as filogenias feitas com dados moleculares tem sido mais objetivas em fornecer pistas sobre a história evolutiva das espécies e das populações de peixes de água doce neotropicais estritamente relacionadas e, além disso, também auxiliam na determinação da distribuição geográfica dessas espécies/populações.

1.4. DNA Mitocondrial

O DNA mitocondrial de animais vem sendo utilizado para aferir o grau de diversidade genética entre populações.

Segundo Avise (1987), o DNA mitocondrial é indicado para análise filogenética entre animais superiores por diversos motivos: está presente em todo o grupo - o que permite que comparações homólogas entre uma grande variedade de organismos possa ser feita seguramente -, é fácil de isolar e analisar, tem estrutura simples, ausência de: DNA repetitivo, elementos transponíveis, pseudogenes e íntrons, possui modo de transmissão direta, sem recombinação ou outros rearranjos gênicos, fornece informações de caráter qualitativo dos quais interrelações filogenéticas podem ser inferidas por critérios de parcimônia e evolui tão rapidamente que as mudanças geralmente surgem dentro do tempo de vida de uma espécie.

O DNA mitocondrial é uma molécula circular de fita dupla, com 37 genes. Destes 13 codificam proteínas, 22 codificam RNAs transportadores e dois codificam RNAs ribossomais (MEYER apud TERCENIO, 2009). Há também uma região não codificante chamada região controle (ou *D-loop*), que determina o início da transcrição do DNA. Esta é a região que mais acumula mutações no mtDNA.

Inúmeros trabalhos que buscam entender as relações filogenéticas e filogeográficas de espécies e/ou populações de peixes (BATISTA e ALVES-GOMES, 2006; DERGAN et al,

2002; FALK et al, 2002; FROUFE, E. et al, 2005) e de outros animais (BUHAY, J. E. e CRANDALL, K. A., 2005; BURBRINK, F. T., 2005; COLANGELO, P. et al, 2005; GRAZZIOTIN, F. G. et al, 2006) tem estudado mtDNA, especialmente o gene *cyt b* (AKIHITO, I. A. et al, 2000; FARIAS, I. P. et al, 2001; LAVOUÉ, S. et al 2000).

Atualmente pouco se conhece sobre estrutura populacional e relações filogenéticas de peixes de riachos das principais espécies que ocorrem na Bacia do Alto Rio Paraná, sobretudo de *Astyanax* que representa um dos gêneros mais especiosos desta bacia (BERTACO e LUCENA, 2006).

1.5. *Astyanax paranae* e sua relação com o complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 é um dos maiores em número de espécies de peixes neotropicais, com 107 espécies válidas descritas (ESCHMEYER apud ORNELAS-GARCIA, 2008). Sua distribuição é ampla: desde os estados do Texas e Novo México, nos Estados Unidos até a Argentina, por diversos tipos de ambientes. A diversidade de habitats que ocupa faz com que este seja um dos gêneros mais complexos de peixes de água doce da Região Neotropical. Apesar de grande ainda é subestimado o número de espécies de *Astyanax*, pois foram descritas 16 novas espécies dentro do gênero somente entre 2003 e 2007, sendo grande parte pertencentes ao complexo *scabripinnis*. A sistemática do gênero é complicada e ainda não está resolvida porque faltam evidências que corroborem seu *status* monofilético (WEITZMAN e MALABARBA, 1998; MELO e BUCKUP, 2006; BERTACO e GARUTTI, 2007). Atualmente a definição de *Astyanax* está baseada na combinação de caracteres propostos por Eigenmann, em 1917, que é a única revisão do gênero disponível, porém muitos destes caracteres são compartilhados com outros gêneros da Família Characidae (Bertaco e Lucena, 2006).

A espécie em questão, *Astyanax paranae* – popularmente conhecida como lambari-de-cabeceira -, foi desmembrada recentemente do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* que, descrita por Eigenmann em 1921, teve suas populações com diferenças morfológicas caracterizadas erroneamente como sendo características de subespécies, e não de espécies distintas estritamente relacionadas. Em 1991 Moreira-Filho e Bertollo foram os primeiros autores a reconhecer *A. scabripinnis* como um complexo de espécies através de caracteres não

somente morfológicos, mas também cariotípicos. Em 2001 duas novas espécies relacionadas ao complexo foram descritas por Bertaco e Malabarba e, desde então, a tendência é considerar as subespécies de *Astyanax scabripinnis* como sendo espécies válidas (Bertaco e Malabarba, 2001; Bertaco e Lucena, 2006).

De acordo com Bertaco e Lucena (2006) são 15 as espécies que compõem o complexo *scabripinnis*: *Astyanax microschemos* (localizada na bacia costeira-ES), *A. intermedius* (Bacia do Paraíba do Sul), *A. laticeps* (Lagoa dos Patos-RS), *A. paranae* (Bacia do Alto Rio Paraná), *A. rivularis* (Rio das Velhas-RJ), *A. jenynsii* (Bacia do Rio Paraíba do Sul), *A. depressirostris* (Rio Cubatão-MG), *A. ojiara* (Bacia do Rio Uruguai, na Argentina), *A. cremnobates* (Bacia do Rio Jacuí-RS), *A. brachypterygium* (bacia dos rios Jacuí e Uruguai-RS), *A. leonidas* (médio Rio Paraná, Argentina), *A. troya* (médio Rio Paraná, Argentina), *A. ita* (Bacia do Rio Iguazu, Argentina), *A. paris* (Bacia do Rio Uruguai, A Argentina) e *A. totae* (Bacia do Rio Iguazu-PR). Embora estas sejam reconhecidas como espécies válidas ainda é necessário um profundo estudo taxonômico e sistemático no complexo *scabripinnis*, para que sejam elucidadas as relações filogenéticas entre estas espécies e novas espécies sejam identificadas.

Considerando-se então como espécies válidas os táxons presentes no complexo *scabripinnis*, *Astyanax parane* (Figura 1) é a única presente (deste complexo) na Bacia do Alto Rio Paraná. Tem como uma das principais características ecológicas (diferentemente das demais espécies do gênero encontradas nesta bacia hidrográfica) hábito restrito à nascentes de riachos, o que certamente reflete na sua estrutura populacional, uma vez que define drástico isolamento entre as populações. Estudos como o de Mizoguchi e Martins-Santos (1998), que encontraram diferentes números cariotípicos para diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* da Bacia do Alto Paraná (agora chamada de *Astyanax paranae*) sugerem que as populações desta espécie nesta bacia possam representar um pequeno complexo de espécies. *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus*, outras duas espécies do gênero, são abundantes nesta bacia, mas facilmente distinguíveis do complexo *scabripinnis*.



Figura 1: *Astyanax paranae*.

As evidências morfológicas e citogenéticas de que, na Bacia do Alto Paraná *A. paranae* não deva constituir uma única espécie e a ausência de dados moleculares populacionais que possam corroborar com a compreensão da filogenia e filogeografia desta espécie justificam o presente trabalho.

2. OBJETIVO

Este trabalho foi idealizado com o objetivo de se estabelecer as relações filogeográficas entre diferentes populações de *Astyanax paranae* residentes na Bacia do Rio Tietê, ou seja, relacionar a filogenia do grupo com a localização geográfica de cada população.

Além disso, pretende-se propor modelos biogeográficos de dispersão e colonização para *Astyanax paranae*, tornando esta espécie um modelo para futuros estudos biogeográficos em outras espécies de peixes de pequeno porte na Bacia do Rio Tietê.

A hipótese a ser testada é a de que “*por se tratar de uma espécie que habita cabeceiras de riachos, haja pouco fluxo gênico entre as populações, possibilitando a existência de clados divergentes ao ponto de caracterizarem diferentes espécies*”.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para se elucidar os padrões filogeográficos de *Astyanax paranae* na Bacia do Rio Tietê foram analisadas sequências do gene mitocondrial *cyt b*.

Inicialmente foram analisados 74 indivíduos de quatro populações de *Astyanax paranae* (Tabela 1), sendo: quatro do Ribeirão Claro, dez do Córrego Canta Galo, oito do Córrego Passa Cinco (todos localizados na cidade de Rio Claro, estado de São Paulo) sete de Botucatu-SP, cinco de Santo André-SP e cinco de Castro-PR (localidade-tipo de *A. paranae*); e sete populações de cinco espécies de *Astyanax* relacionadas (*Astyanax fasciatus*: quatro indivíduos do Ribeirão Claro, dois do Córrego Passa Cinco, e três de Jaíba-MG; *Astyanax altiparanae*: seis indivíduos de Penápolis-SP; *Astyanax scabripinnis*: cinco indivíduos de Bertioga-SP; *Astyanax biotae*: um indivíduo de Diamante do Norte-PR (localidade-tipo de *A. biotae*); e *Astyanax bockmanni*: três indivíduos do Ribeirão Claro e nove de Bauru-SP. Como grupo externo foi utilizado um exemplar de *Serrapinnus notomelas*. Os municípios aonde foram realizadas as coletas encontram-se na Figura 2. Os indivíduos analisados foram classificados por especialistas segundo caracteres morfológicos.

Tabela 1: Indivíduos amostrados com seus respectivos: número da amostra, nome da espécie, e local de coleta (organizado em bacia hidrográfica, sub-bacia hidrográfica e cidade/estado).

Nº amostra	Espécie	Bacia Hidrográfica	Sub-Bacia (Cidade/ESTADO)
50apar993	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)
51apar994	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)
52apar995	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)
53apar996	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)
54apar997	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)
3aparD1	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
4aparD2	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
5aparD3	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
7apar333	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
12apar367	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
13apa369	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
14apar372	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
15apara374	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
8apar378	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
9apare379	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
12ap442	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
13apar443	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
14apa444	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
15apara445	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
16apare446	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
17apar447	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
16para448	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
23apar479	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
24apar482	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
25apar484	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
23apar487	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
24apar489	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
25apar490	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
26apar493	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
27apar495	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
28apar502	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
29apar503	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Canta Galo (Rio Claro/SP)
20apar504	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Rio Paranapiacaba (Santo André/SP)
21apar505	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Rio Paranapiacaba (Santo André/SP)
22apar506	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Rio Paranapiacaba (Santo André/SP)
26apar507	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Rio Paranapiacaba (Santo André/SP)
27apar508	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Rio Paranapiacaba (Santo André/SP)
19apar538	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Cascatinha (Botucatu/SP)
10apar753	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
11apar754	<i>Astyanax paranae</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
1abock461	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
2abock463	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)

3bock465	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
34abock918	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Barra Seca (Bauru/SP)
35abock934	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
36abock935	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
38abock937	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
39abock943	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
40abock944	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
41abock945	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
42abock946	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)
49abock957	<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Tietê	Marapuama (Bauru/SP)
6afasc13	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
7afasc14	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Córrego Passa Cinco (Rio Claro/SP)
9afasc33	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
10afasc36	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
5afasc298	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
6afasc299	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Tietê	Ribeirão Claro (Rio Claro/SP)
31afasc913	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio São Francisco	Rio Verde Grande (Jaíba/MG)
32afasc914	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio São Francisco	Rio Verde Grande (Jaíba/MG)
33afasc915	<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio São Francisco	Rio Verde Grande (Jaíba/MG)
43abiot947	<i>Astyanax biotae</i>	Rio Paranapanema	Córrego Fazenda Água Mole (Diamante do Norte/PR)
44ascab952	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Costa Leste	Rio Itatinga (Bertioga/SP)
45ascab953	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Costa Leste	Rio Itatinga (Bertioga/SP)
46ascab954	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Costa Leste	Rio Itatinga (Bertioga/SP)
47ascab955	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Costa Leste	Rio Itatinga (Bertioga/SP)
48ascab956	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Costa Leste	Rio Itatinga (Bertioga/SP)
17aalti455	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
18aalti456	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
19aalti457	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
20aaltip458	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
21aaltip459	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
4altipa460	<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)
AP34snoton	<i>Serrapinnus notomelas</i>	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta

Os peixes foram coletados através de rede de arrasto manual e de covo. Após a coleta o material foi fixado em álcool 70% ainda em campo. Em laboratório os indivíduos foram classificados, etiquetados e tiveram uma amostra de músculo ou brânquia retirada e armazenada em tubo *eppendorf*, com álcool 70%, também etiquetado. Os peixes coletados encontram-se no museu do Laboratório de Genética de Peixes (LGP). Alguns exemplares foram doados pelo Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Botucatu-SP.

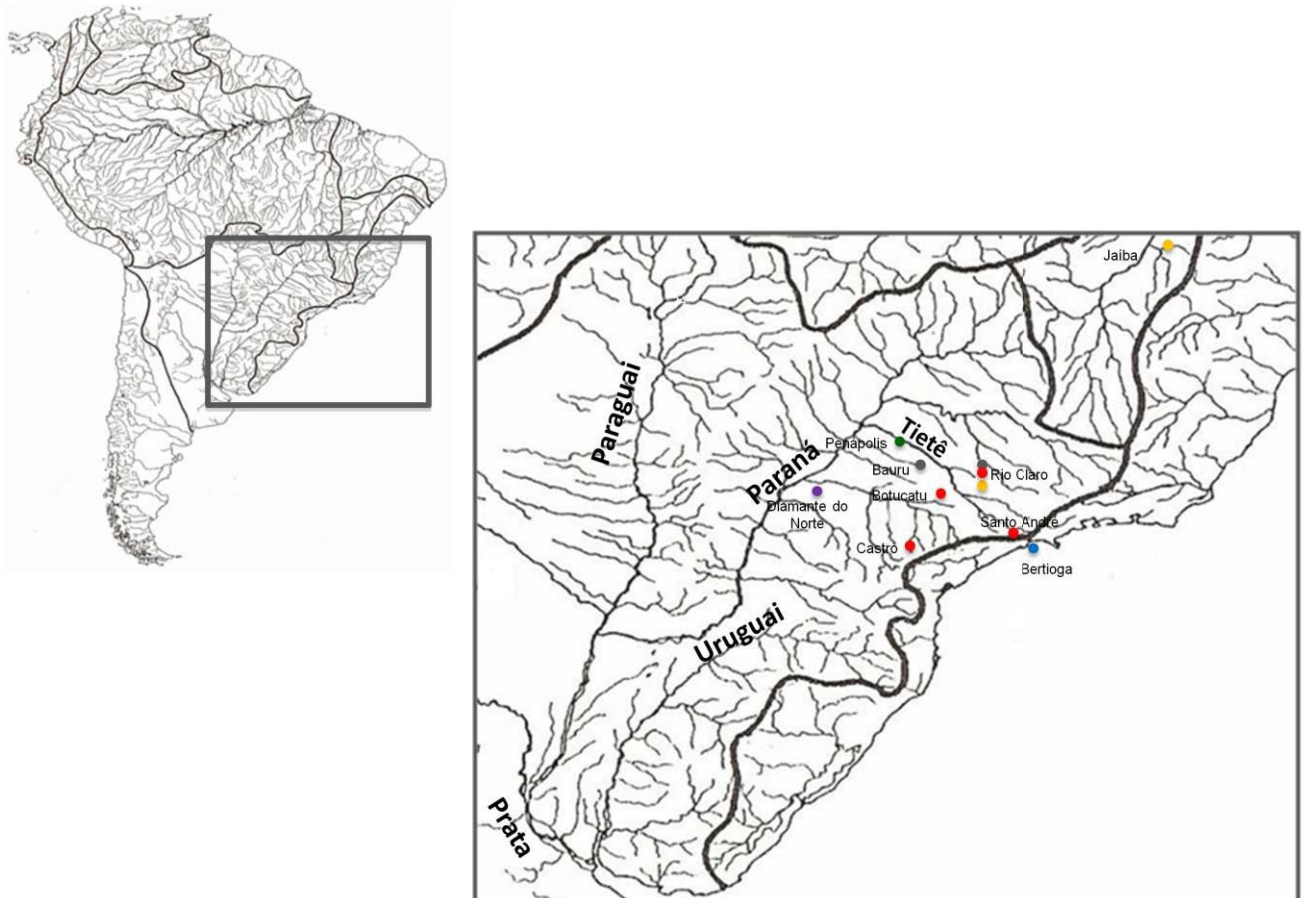


Figura 2: Mapa da América do Sul com detalhe para a Bacia do Rio Paraná. Em destaque os locais de coleta. Ponto roxo: *A. biotae* - Diamante do Norte-PR; verde: *A. altiparanae* - Penápolis-SP; cinza: *A. bockmanni* - Bauru e Rio Claro-SP; vermelho: *A. paranae* - Castro-PR, Botucatu, Rio Claro e Santo André-SP; azul: *A. scabripinnis* - Bertiooga-SP.

3.2.2. Extração de DNA

Todo o DNA foi obtido através de amostras de fígado, músculo ou brânquias utilizando-se a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (Sambrook, 2001). O protocolo de extração de DNA utilizado foi o seguinte:

Preparar uma solução de lise contendo em cada tubo *ependorf* (1000 μ L) os seguintes reagentes (Tabela 2):

Tabela 2: Reagentes utilizados para extração de DNA e suas respectivas quantidades.

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

2. Colocar cada amostra de tecido em um tubo *ependorf* juntamente com uma solução de lise recém preparada e dar um vórtex de 15 segundos em cada tubo;
3. Deixar os tubos em estufa a 55 °C por 4 horas ou a 37 °C *overnight*;
4. Adicionar aos tubos 8 μ L de RNAase, dar um vórtex e deixar em estufa a 37°C por mais 1 hora, agitando o tubo aos 30 minutos;
5. Levar os tubos com os tecidos completamente digeridos para a capela e adicionar 400 μ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1);
6. Dar um vórtex de 30 segundos e, rapidamente, centrifugar a 14.000 rotações por minuto (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 com uma pipeta;
8. Adicionar a cada tubo 60 μ L de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e inverter o tubo repetidamente para a completa mistura do sal com o DNA;

9. Adicionar a cada tubo 600 μ L de etanol absoluto gelado e inverter o tubo como no passo anterior. Caso haja formação de uma nuvem de DNA, transferi-la para um novo tubo contendo 1000 μ L de etanol absoluto;

10. Centrifugar os tubos a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa separação da mistura de etanol e acetato de sódio do DNA;

11. Adicionar 150 μ L de etanol 70% a temperatura ambiente e centrifugar novamente a 14.000 rpm por mais 30 minutos;

12. Descartar o sobrenadante na pia, certificando-se que o precipitado de DNA continua aderido à parede do tubo;

13. Repetir os passos 12 e 13 (exceto nos tubos onde ocorreu a formação de nuvem);

14. Secar o DNA em estufa a 37°C por 30 minutos, colocando os tubos abertos de cabeça para baixo sobre folhas de papel absorventes;

15. Ressuspender o DNA com 100 μ L de água Milli-Q autoclavada ou com 250 μ L (para as amostras que formaram nuvem), e agitar o tubo delicadamente para soltar o DNA que está aderido à parede;

16. Levar o material para a estufa a 37°C por 40 minutos e, posteriormente, transferir os tubos para a geladeira (4°C) e manter *overnight* para a completa ressuspensão;

17. Armazenar em freezer (-20°C) para conservar a longo prazo.

3.2.3. Amplificação de DNA

Em um termociclador EPPENDORF® (modelo *MasterCycler EP Gradient*) o DNA total foi submetido a uma reação de polimerização em cadeia, mais conhecida pela sigla PCR (*Polymerization Chain Reaction*). Esta reação consiste de várias cópias de um gene pré-determinado a partir do DNA total. Para copiar o gene de interesse deve-se ter uma molécula iniciadora da cópia específica para este gene (chamada *primer*). Para a cópia do *cyt b* foram utilizados os seguintes *primers* específicos (o *forward* copia no sentido 5'-3', e o *reverse* copia no sentido 3'-5') :

Forward L-GluDG-CitF 5' - TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3'

Reverse H-16460-CitR 5' - CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G – 3'

A reação de PCR num termociclador submete as amostras a ciclos repetitivos a diferentes temperaturas para que os reagentes copiem o gene do DNA total. Para o *cyt b* a reação de PCR foi programada da seguinte forma: as amostras passavam por 1 ciclo inicial com duração de 2 minutos a 94 °C seguido por 35 ciclos de: 45 segundos a 94 °C (para a separação das duplas-fitas de DNA), 45 segundos a 54 °C (para anelamento dos *primers* às fitas-simples), 1 minuto e 30 segundos a 65 °C e 5 minutos a 72°C (para a extensão da fita em formação).

Para preparar a reação de PCR foram usados os seguintes reagentes nas seguintes quantidades (Tabela 3):

Tabela 3: Reagentes usados na reação de PCR e suas respectivas quantidades.

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
Mix PCR * (Qiagen)	6,25µL
Água Milli Q	5,25µL
<i>Primer</i> F 10µM	0,5µL
<i>Primer</i> 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 dNTPs (dideoxinucleotídeo trifosfato) 200µM.

Os dNTPs são os nucleotídeos que servirão de matéria-prima para as cópias de DNA e a enzima Taq DNA polimerase acopla os nucleotídeos à fita em formação.

Para o sequenciamento das amostras o produto da reação de PCR teve peso molecular em torno de 50ng de DNA. Para a quantificação de DNA das amostras os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, aplicados em gel de agarose à concentração de 1% corado com 2 μ L de *SYBER Safe* (10.000X) da *Invitrogen*[®] (Figura 4). As amostras foram coradas com 1 μ L de *blue juice* (10X) e aplicados no gel. Após a eletroforese o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta. As amostras coradas continham DNA. Para a quantificação do peso das amostras foram aplicados também ao gel marcadores de peso molecular Lambda (λ) DNA 30ng e 50ng. As amostras que não amplificaram ou não possuíam peso molecular próximo a 50ng foram descartadas e refeitas até que fosse conseguido um produto de PCR com este peso. As amostras em que não foi possível obter 50ng de peso não foram sequenciadas.

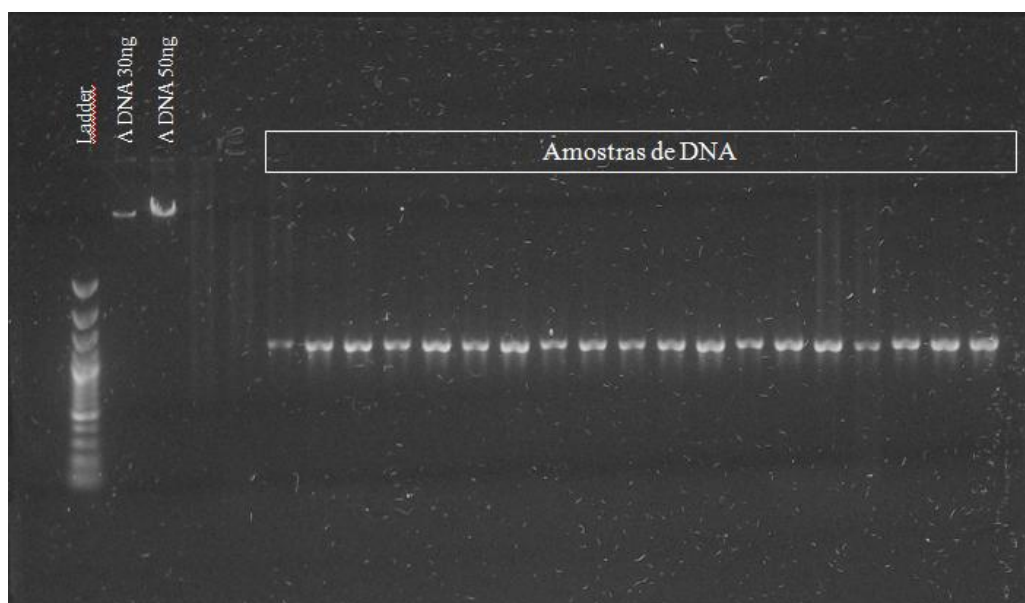


Figura 4: Gel de Agarose 1% mostrando as amostras de DNA, os marcadores λ DNA 30ng e 50ng e o Ladder 100pb.

3.2.4. Limpeza do produto de PCR para o sequenciamento

Após a amplificação do gene (reação de PCR) as amostras foram purificadas antes do sequenciamento. A limpeza se deu através de uma reação com a enzima EXOSAP (GE HealthCareTM) em termociclador seguindo-se o programa: 1 ciclo de 60 minutos a 37 °C e 1 ciclo de 15 minutos a 80 °C, de acordo com o protocolo a seguir:

1. Transferir 10 μ L do produto de PCR a tubos novos;
2. Adicionar a cada tubo 2 μ L de água Milli-Q;
3. Adicionar a cada tubo 2 μ L de EXOSAP.

As amostras limpas foram enviadas para serem sequenciadas na Korea – Empresa *Macrogen Inc.* através de terceirização de serviço.

3.2.5. Análise das seqüências do gene *cyt b*

As seqüências das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) foram verificadas através de gráficos gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright* © versão 7.0.9.0 (HALL, 1999) (Figura 5), e corrigidas, quando necessário, no programa DAMBE (*Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*) versão 5.0.47 (XIA & XIE, 2001) (Figura 6).

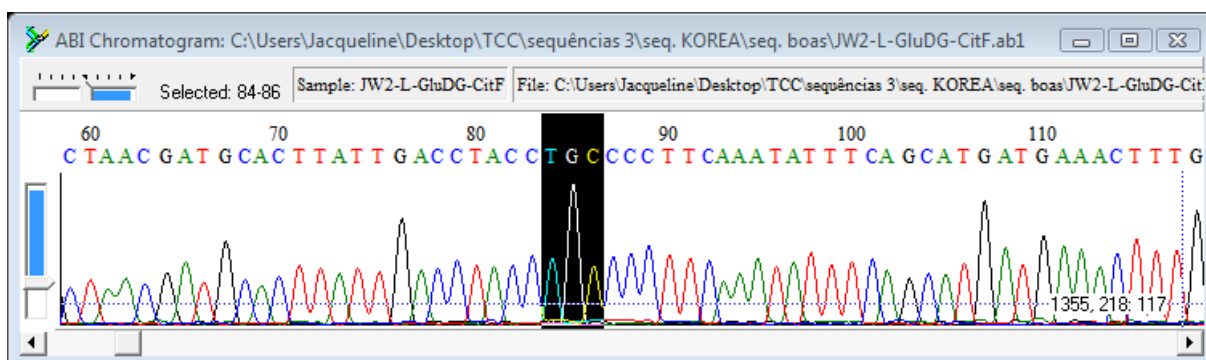


Figura 5: Gráfico gerado pelo programa *BioEdit* mostrando os picos de cada base nitrogenada. Em destaque as bases T, G e C.

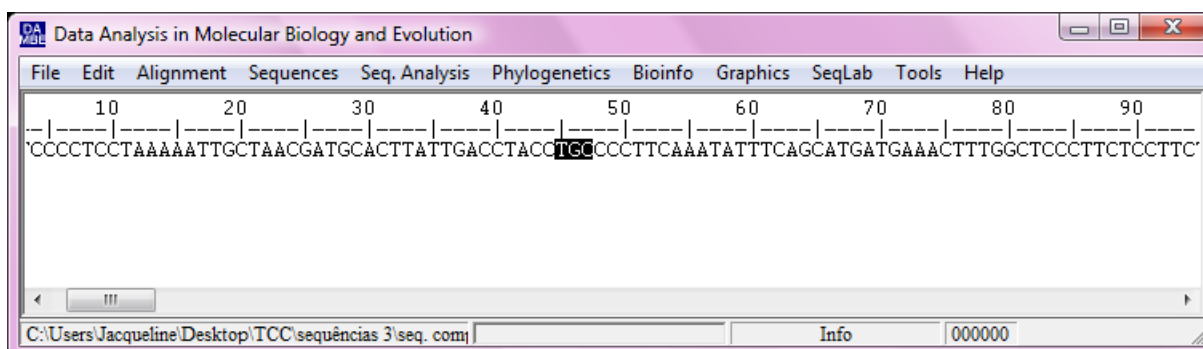


Figura 6: Janela de edição de sequências em forma de texto exibida pelo programa DAMBE. Em destaque novamente as bases T, G e C.

O DAMBE também foi utilizado para o alinhamento das sequências de todos os indivíduos e para a elaboração do gráfico (Figura 6), para verificar se há saturação de mutações entre as sequências usadas na matriz de dados (gráfico de transição - mutação entre bases da mesma natureza química, isto é, entre purinas, A e G, ou entre pirimidinas, C e T e transversão - mutação de uma purina para uma pirimidina e vice-versa). O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4.0.2 (TAMURA, 2007) foi utilizado para obter a composição nucleotídica das sequências.

Para verificar qual modelo de evolução melhor explica os dados analisados utilizou-se o programa *Model Test* versão 3.7 (POSADA e CRANDALL, 1998). O modelo escolhido foi o TVM+G (parâmetro de forma da distribuição gama) que considera válidas as seguintes taxas de substituição de bases: 89437.2500 de A para C; 604651.4375 de A para G; 24865.5156 de A para V; 15950.1240 de C para G; 604651.4375 de C para T; e 1 de G para T. Esses parâmetros foram utilizados para a construção das árvores filogenéticas pelos métodos de *Neighbor-Joining* (NJ), pelo programa PAUP * v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) com 1000 reamostragens pelo método de *Bootstrap*, e *Análise Bayesiana* (BY), através do programa *Mr. Bayes* versão 3.1.2 (HUELSENENCK e RONQUIST, 2001) (onde foram calculadas duas milhões de gerações, tendo sido retirada da análise as 80 mil primeiras árvores e as restantes foram utilizadas para se obter uma árvore consenso de maioria com valores de *posterior probability* acima de 50%). As árvores filogenéticas construídas pelo método de *Maximum Parsimony* (MP) foram geradas no programa PAUP * v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). Para o cálculo de distância entre os indivíduos foi utilizado o programa *Sequencer* 6.1.0.

Para estimar o tempo de divergência entre sequências Ornelas-Garcia, Domínguez-Domínguez e Doadrio (2008) calibraram o relógio molecular com uma taxa de evolução de 0,8% por milhão de ano para o gene *cyt b* para o gênero *Astyanax*. Os eventos considerados

foram: a elevação das cadeias de montanhas Merida-Perija (porção venezuelana da Cordilheira dos Andes) de 8 a 12 milhões de anos atrás; a presença de fósseis de *Colossoma macropomum* (tambaqui) na Bacia do Rio Magdalena há pelo menos 15 milhões de anos e a formação do Cinturão Vulcânico Trans-Mexicano de 3 a 6 milhões de anos atrás. Através da calibração do relógio molecular a partir de um evento geológico é possível calcular a quanto tempo populações e/ou espécies se divergiram através da relação entre taxa de evolução do gene e dos valores da distância genética entre as populações e/ou espécies.

Para as análises filogeográficas foi utilizado o programa TCS versão 1.21 (CLEMENT et al, 2000) através de elaboração de rede de haplótipos pelo método de Parcimônia.

4. RESULTADOS

4.1. Análise nucleotídica das sequências do gene *cyt b*

Dos 1140 pares de base (pb) que compõe o gene *cyt b*, apenas 1087 puderam ser analisados, devido a incertezas no início e fim de algumas sequências, fazendo com que fossem retiradas cerca de 50 pb de todas as sequências para a análise final. A média nucleotídica dos indivíduos analisados (Tabela 4) de *Astyanax paranae*, outras espécies do gênero e o grupo externo foi de 30,9% de timina (T), 29,1% de citosina (C), 26,1% de adenina (A) e 13,9% de guanina (G).

Analisando-se os indivíduos do gênero *Astyanax*, isto é, excluindo-se apenas *Serrapinnus notomelas* (grupo externo), dos 1087 pares de bases analisados há entre os indivíduos: 854 pb conservados, 233 pb variáveis, 216 pb informativos para análise de *Maximum Parsimony* e 17 pb *Singleton* - que são diferentes em apenas um indivíduo em relação aos outros.

Tabela 4: Média de cada nucleotídeo em cada um dos indivíduos. Na última linha tem-se a média de cada nucleotídeo em todos os indivíduos. Na última coluna tem-se o total de nucleotídeos em cada indivíduo.

Número amostra	T	C	A	G	Total
3aparD1	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
4aparD2	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
5aparD3	30,8	29,1	26,0	14,1	1087,0
6afasc13	30,9	29,3	25,6	14,3	1087,0
7afasc14	31,1	29,1	25,7	14,2	1087,0
9afasc33	31,1	29,1	25,6	14,3	1087,0
10afasc36	31,0	29,2	25,6	14,3	1087,0
5afasc298	30,9	29,2	25,7	14,3	1087,0
6afas299	30,9	29,2	25,7	14,3	1087,0
7apar333	30,7	29,3	26,0	13,9	1087,0
12apar367	30,8	29,2	25,9	14,2	1087,0
13apa369	30,7	29,3	25,9	14,1	1087,0
14apar372	30,9	29,1	25,9	14,2	1087,0
15apara374	30,8	29,2	25,9	14,1	1087,0
8apar378	30,9	29,1	26,0	14,0	1087,0
9apare379	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
12ap442	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
13apar443	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
14apa444	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
15apara445	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
16apare446	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
17apar447	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
16para448	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
17aalti455	32,5	27,4	26,5	13,6	1087,0
18alti456	32,4	27,5	26,5	13,6	1087,0
19aalt457	32,4	27,5	26,4	13,7	1087,0
20aaltip458	32,5	27,4	26,6	13,5	1087,0
21altip459	32,7	27,2	26,3	13,8	1087,0
4altipa460	32,6	27,3	26,4	13,7	1087,0
1abock461	30,4	29,6	26,3	13,7	1087,0
2abock463	30,7	29,3	26,1	13,9	1087,0
3bock465	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
23apar479	31,0	29,0	25,9	14,1	1087,0
24apar482	30,8	29,2	25,9	14,1	1087,0
25apar484	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
23apar487	30,8	29,2	25,9	14,1	1087,0
24apar489	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
25apar490	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
26apar493	30,9	29,1	25,9	14,1	1087,0
27apar495	30,8	29,2	25,9	14,1	1087,0
28apar502	30,9	29,1	26,0	14,0	1087,0
29apar503	30,7	29,3	26,3	13,7	1087,0
20apar504	30,7	29,3	26,2	13,8	1087,0
21apar505	30,5	29,4	26,2	13,8	1087,0
22apar506	30,7	29,3	26,3	13,7	1087,0
26apar507	30,6	29,3	26,2	13,8	1087,0
27apar508	30,5	29,3	26,3	13,8	1087,0
19apar538	30,6	29,3	26,3	13,7	1087,0
10apar753	31,1	29,0	25,9	14,1	1087,0
11apar754	30,8	29,2	25,9	14,1	1087,0

31afasc913	31,2	28,7	25,8	14,4	1087,0
32afasc914	31,2	28,7	25,8	14,4	1087,0
33afasc915	31,2	28,9	25,6	14,4	1087,0
34abock918	30,7	29,3	25,9	14,1	1087,0
35abock934	30,5	29,4	26,2	13,9	1087,0
36abock935	30,7	29,3	25,9	14,1	1087,0
38abock937	30,8	29,2	26,0	14,0	1087,0
39abock943	30,5	29,4	26,2	13,9	1087,0
40abock944	30,7	29,3	25,9	14,1	1087,0
41abock945	30,5	29,4	26,2	13,9	1087,0
42abock946	30,5	29,4	26,2	13,9	1087,0
43abiot947	31,0	29,1	25,7	14,3	1087,0
44ascab952	30,5	29,5	26,2	13,8	1087,0
45ascab953	30,5	29,5	26,2	13,8	1087,0
46ascab954	30,5	29,5	26,1	13,9	1087,0
47ascab955	30,5	29,5	26,2	13,8	1087,0
48ascab956	30,5	29,5	26,2	13,8	1087,0
49abock957	30,7	29,3	25,9	14,1	1087,0
50apar993	30,9	29,2	26,2	13,7	1087,0
51apar994	30,7	29,3	26,1	13,8	1087,0
52apar995	30,7	29,3	26,1	13,8	1087,0
53apar996	30,8	29,2	26,1	13,9	1087,0
54apar997	30,7	29,3	26,2	13,7	1087,0
AP34snoton	29,7	29,3	27,0	14,0	1087,0
Média	30,9	29,1	26,1	13,9	1087,0

A relação entre transições (s) e transversões (v) contra a divergência genética pelo modelo de evolução de sequências *Jukes-Cantor 69* mostrou que não houve saturação dos dados (os pontos “s” e “v” não se cruzam) (Figura 6).

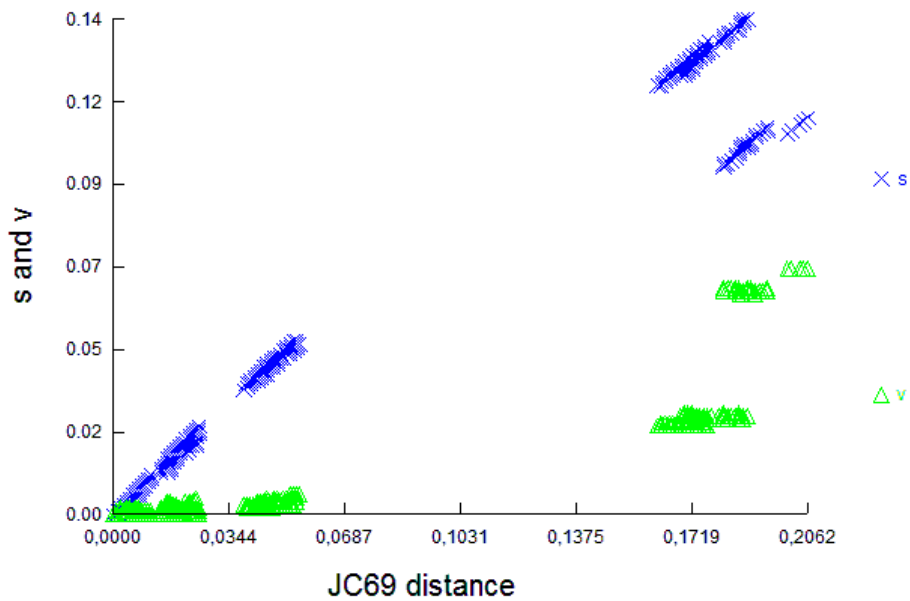


Figura 6: Relação entre transição (s) e transversão (v) e a distância *Jukes-Cantor 69*. Gráfico gerado pelo programa DAMBE.

4.2. Análises filogenéticas das sequências

As árvores filogenéticas calculadas pelos três métodos utilizados: *Neighbor-Joining* (NJ) (Figura 7), *Maximum Parsimony* (MP) (Figura 8) e *Análise Bayesiana* (BY) (Figura 9) recuperaram as mesmas topologias. As únicas variações entre os métodos foram em relação aos valores de *Bootstrap* (em NJ e MP) e de *posterior probability* (em BY).

Os exemplares de *Astyanax paranae* foram agrupados em três diferentes clados: I, II e III (Figura 7). O Clado I, suportado pelos valores 67; 93; 94 (valor de *Bootstrap* em NJ; valor de *Bootstrap* em MP; valor de *posterior probability* em BY, respectivamente) é composto por *A. paranae* de Rio Claro e por *Astyanax bockmanni* de Rio Claro e de Bauru.

No Clado II (78; 84; 98), assim como no Clado I, houve o agrupamento de *A. paranae* e *A. bockmanni*, porém com adição de *A. scabripinnis* de Bertioga. Os exemplares de *A. paranae* são de Botucatu e Santo André, e os de *A. bockmanni* são de Rio Claro e Bauru. O ramo constituído por *A. paranae* e *A. bockmanni* (82; 83; 98) comporta-se como grupo-irmão de *A. scabripinnis* (97; 81; 99).

No Clado III (94; 98; 100) houve o agrupamento de todos os indivíduos de *A. fasciatus*, do indivíduo de *A. biotae* e de *A. paranae* de sua localidade-tipo (Castro-PR). Aqui *A.*

paranae (95; 91; 100) se comporta como grupo-irmão do ramo composto por *A. biotae* mais *A. fasciatus* (70; 82; 99).

O Clado IV (100; 100; 100) é formado exclusivamente por amostras de *A. altiparanae*, que se comporta como grupo-irmão de todas as outras espécies de *Astyanax sp.* - ou de todos os outros clados.

Estes resultados revelam que, na Bacia do Rio Tietê, *A. paranae* não forma um grupo monofilético.

Serrapinnus notomelas foi utilizado como grupo externo para as três árvores filogenéticas.

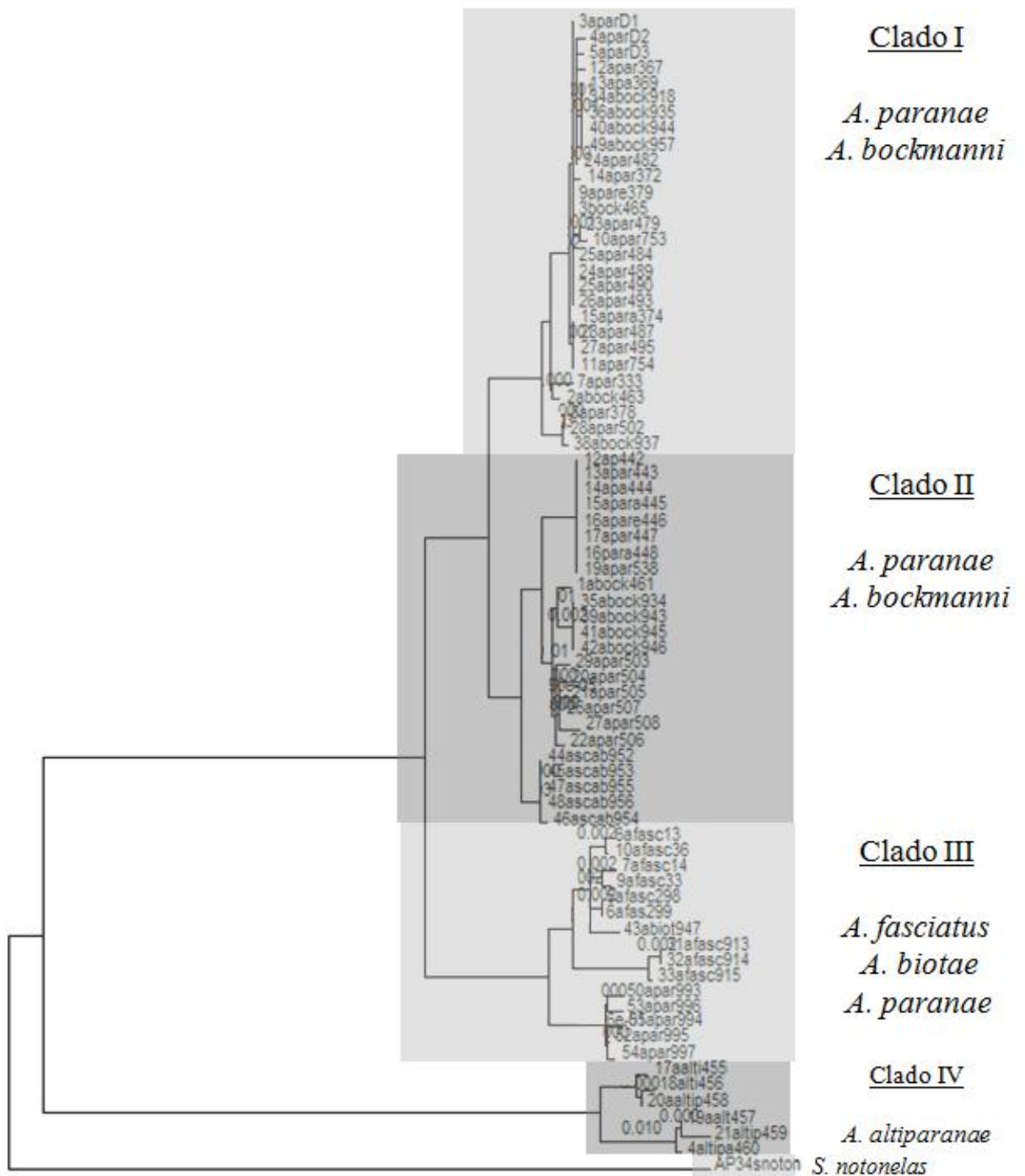


Figura 7: Árvore filogenética pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), construída pelo PAUP*.

bootstrap

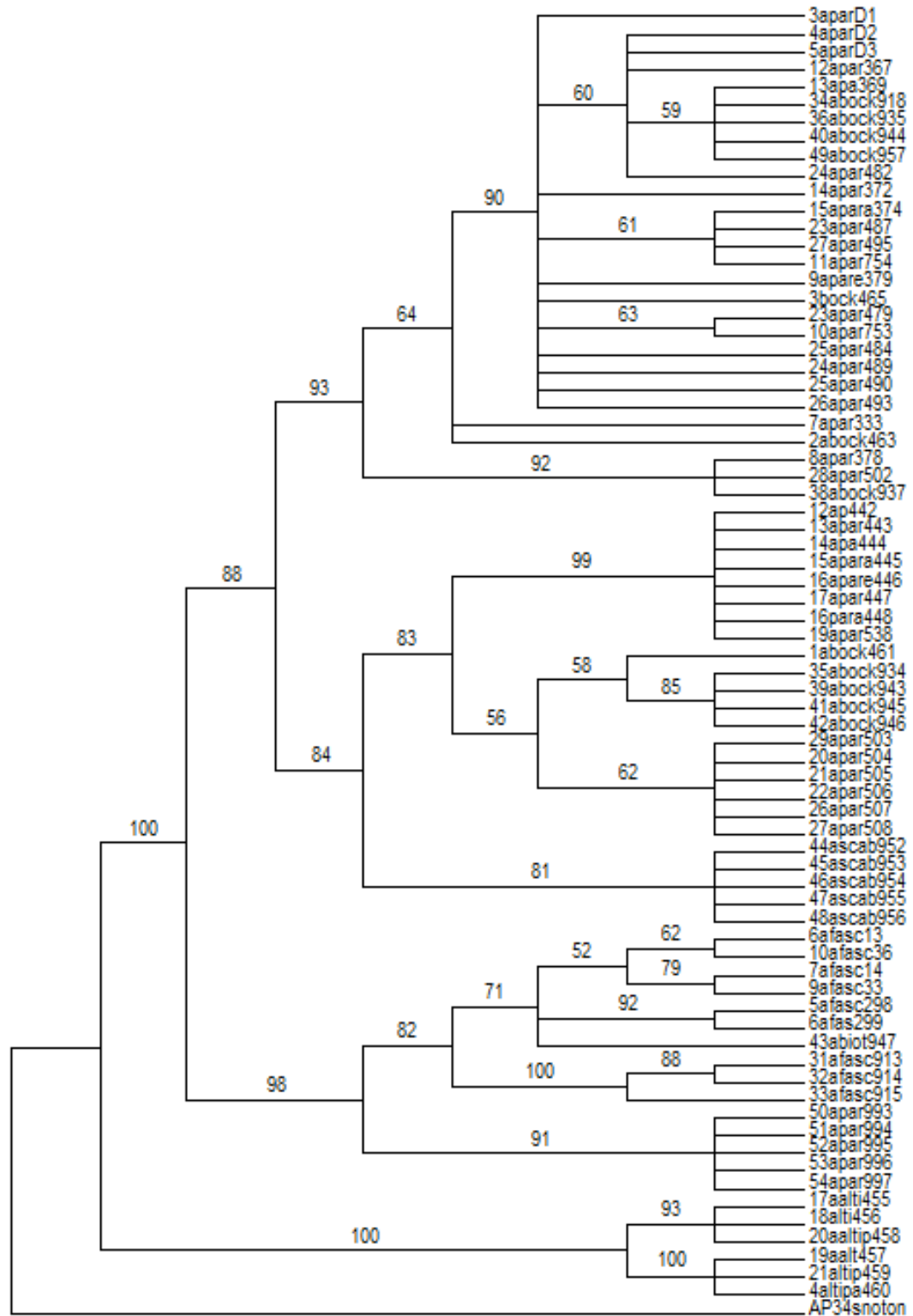


Figura 8: Árvore filogenética pelo método de *Maximum Parsimony* (MP) construída pelo PAUP*.

majority rule

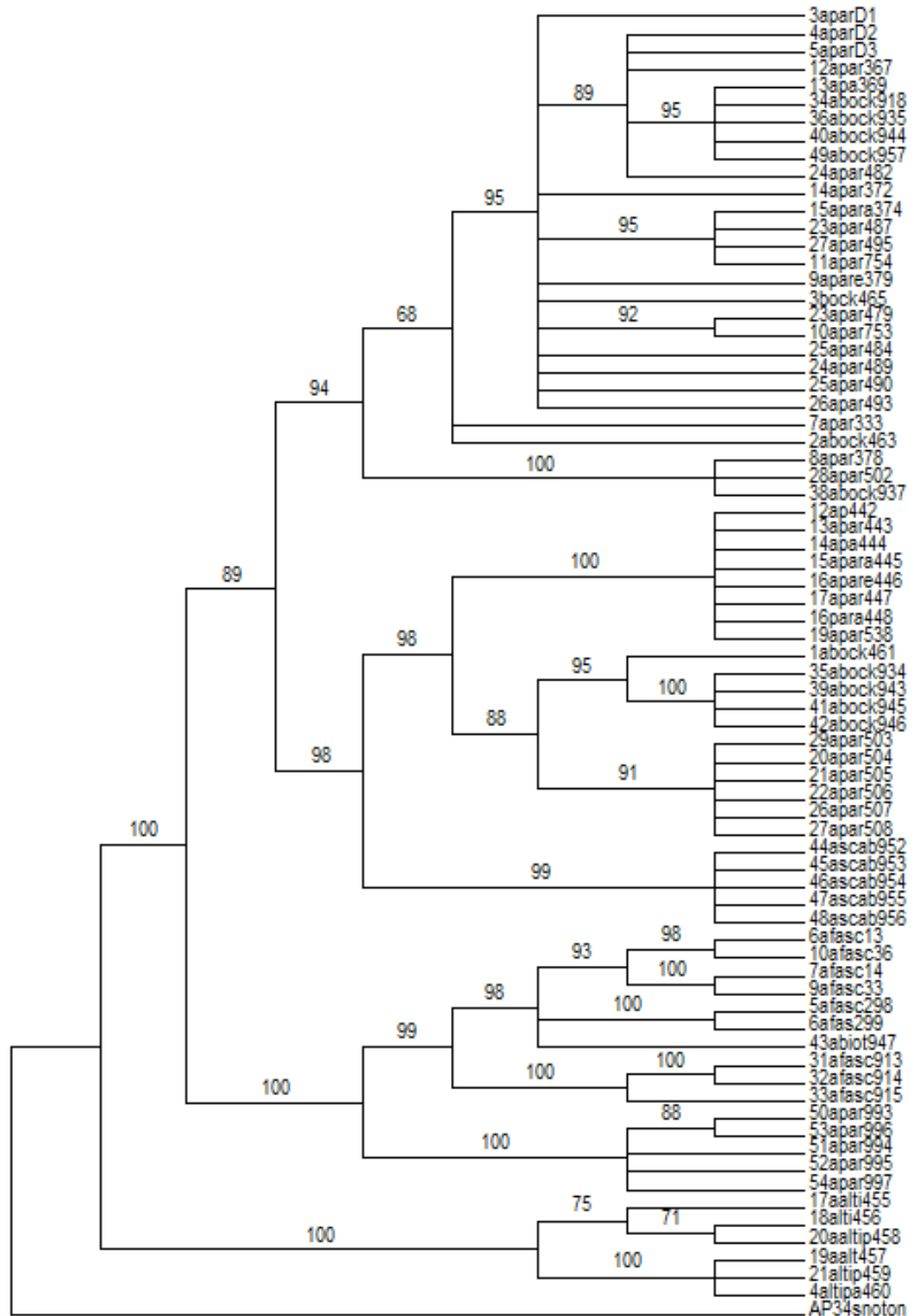


Figura 9: Árvore filogenética pelo método de Análise Bayesiana (BY), construída pelo *Mr. Bayes*.

4.3. Distâncias entre as sequências e Relógio Molecular

As distâncias genéticas (em porcentagem) entre os indivíduos calculadas pelo programa *Sequencer* apresentam-se nas Tabelas 5 (distância entre espécies), 6 (distância entre clados) e 7 (distância entre populações). Além da distância (porção inferior-esquerda das tabelas) é dado o desvio padrão. Os valores em *itálico* referem-se às distâncias dentro de cada grupo que, quando são formados por apenas um indivíduo possuem valores nulos. Os valores em *negrito* (porção superior-direita da tabela) representam o tempo de divergência aproximado entre os grupos, em milhões de anos (Ma).

Para efeitos de análise os indivíduos dos Clado I e II, os dois formados por *A. paranae* e *A. bockmanni* juntos, foram considerados cada um como sendo uma espécie, excluindo-se *A. scabripinnis*, que continua sendo analisada como espécie separada. Para as espécies de *Astyanax* (Tabela 5) as distâncias dentro dos grupos variaram entre $0,31 \pm 0,12\%$, dentro de *A. paranae* (localidade-tipo), e $1,18 \pm 0,78\%$ dentro de *A. altiparanae* (lembrando que os valores nulos não são considerados porque ocorrem quando há apenas um indivíduo no grupo). Entre as espécies a menor distância foi entre *A. biotae* e *A. fasciatus* ($0,83 \pm 0,51\%$) e a maior distância foi entre *A. altiparanae* e *A. biotae* com $15,88 \pm 0,49\%$ de divergência entre as sequências. A segunda maior distância foi entre *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, com $15,89 \pm 0,43\%$ de divergência entre as sequências. Como esperado as maiores distâncias genéticas se deram entre o grupo externo e as espécies de *Astyanax*, variando de $16,21 \pm 0,12\%$ (entre *S. notonelas* e *A. paranae* de Castro-PR) a $17,77 \pm 0,20\%$ (entre *S. notonelas* e *A. altiparanae*).

Astyanax paranae da localidade-tipo diverge dos indivíduos dos Clados I e II (que também contém *A. paranae* de outras localidades) em $4,54 \pm 0,13\%$ e $4,45 \pm 0,17\%$, respectivamente, sendo mais próxima geneticamente das espécies *A. fasciatus* ($1,91 \pm 0,27\%$ de divergência) e *A. biotae* ($1,64 \pm 0,12\%$ de divergência).

Tabela 5: Distâncias genéticas entre as espécies (porção inferior-esquerda), distância genética dentro de cada espécie (em itálico) e tempo de divergência entre as espécies (em negrito) em Ma. Para efeitos de comparação aqui os Clados I e II* são considerados como espécies. * com exceção de *A. scabripinnis*.

	<i>Clado I</i>	<i>Clado II*</i>	<i>A. scabripinnis</i>	<i>A. fasciatus</i>	<i>A. biotae</i>	<i>A. paranae</i>	<i>A. altiparanae</i>	<i>S. notonelas</i>
<i>Clado I</i>	<i>00.33±0.27</i>	2,81	1,9	5,72	5,72	5,67	18,87	/
<i>Clado II*</i>	<i>02.25±0.17</i>	<i>00.53±0.33</i>	1,48	5,67	5,58	5,56	18,75	/
<i>A. scabripinnis</i>	<i>01.52±0.57</i>	<i>01.19±0.53</i>	<i>00.64±0.89</i>	5,25	5,17	5,17	18,65	/
<i>A. fasciatus</i>	<i>04.58±0.37</i>	<i>04.54±0.39</i>	<i>04.20±0.42</i>	<i>00.99±0.61</i>	1,03	2,39	19,86	/
<i>A. biotae</i>	<i>04.58±0.07</i>	<i>04.47±0.12</i>	<i>04.14±0.23</i>	<i>00.83±0.51</i>	<i>00.00±0.00</i>	2,05	19,85	/
<i>A. paranae</i>	<i>04.54±0.13</i>	<i>04.45±0.17</i>	<i>04.14±0.27</i>	<i>01.91±0.27</i>	<i>01.64±0.12</i>	<i>00.31±0.12</i>	19,66	/
<i>A. altiparanae</i>	<i>15.10±0.29</i>	<i>15.00±0.29</i>	<i>14.92±0.29</i>	<i>15.89±0.43</i>	<i>15.88±0.49</i>	<i>15.73±0.51</i>	<i>01.18±0.78</i>	/
<i>S. notonelas</i>	<i>16.47±0.06</i>	<i>16.94±0.10</i>	<i>16.87±0.20</i>	<i>16.66±0.15</i>	<i>16.65±0.00</i>	<i>16.21±0.12</i>	<i>17.77±0.20</i>	<i>00.00±0.00</i>

Entre clados a maior distância se deu entre o clado formado por *A. altiparanae* (Clado IV) e o formado por *A. fasciatus* juntamente com *A. biotae* (Clado III), sendo de 15,84% a divergência entre eles - novamente não considerando o grupo externo. E a menor distância foi de 2,15±0,25%, entre os Clados I e II. Dentro dos clados a menor distância ocorre dentro do Clado I (0,33±0,27% de divergência) e a maior dentro do Clado IV (1,18±0,78%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distâncias genéticas entre os clados e entre os clados e o grupo externo (porção inferior-esquerda); distância dentro de cada clado (em itálico) e tempo de divergência entre os clados (em negrito), em Ma.

	<i>Clado I</i>	<i>Clado II</i>	<i>Clado III</i>	<i>Clado IV</i>	<i>S. notonelas</i>
<i>Clado I</i>	<i>00,33±0,27</i>	2,69	5,71	18,87	/
<i>Clado II</i>	<i>02,15±0,25</i>	<i>00,66±0,35</i>	5,52	18,72	/
<i>Clado III</i>	<i>04,57±0,30</i>	<i>04,42±0,36</i>	<i>01,33±0,70</i>	19,8	/
<i>Clado IV</i>	<i>15,10±0,29</i>	<i>14,98±0,29</i>	<i>15,84±0,46</i>	<i>01,18±0,78</i>	/
<i>S. notonelas</i>	<i>16,47±0,06</i>	<i>16,94±0,09</i>	<i>16,51±0,26</i>	<i>17,77±0,20</i>	<i>00.00±0.00</i>

De acordo com a Tabela 6, assim como a distância genética, consequentemente o tempo de divergência também é pequeno entre os Clados I e II (2,69 milhões de anos). O Clado IV foi o mais antigo a se formar, divergindo-se dos outros (I, II e III) de 18,72 a 19,8 milhões de anos atrás.

Entre as espécies o tempo de divergência (Tabela 5) variou de 1,03 milhão de ano, entre *A. fasciatus* e *A. biotae*, e 19,86 milhões de anos, entre *A. fasciatus* e *A. altiparanae*.

Analisando-se o tempo de divergência desde a separação do primeiro clado do restante do grupo obteve-se os seguintes resultados: o maior tempo de divergência se deu entre *A. altiparanae* (Clado IV) e o ancestral comum aos Clados I, II e III (há 23 milhões de anos

Na Bacia do Rio Tietê *A. altiparanae* foi a primeira espécie a se diversificar do restante do grupo, que mais tarde deu origem a *A. fasciatus*, e aos indivíduos dos clados I e II presentes nesta bacia e ainda a *A. scabripinnis*, que colonizou a bacia costeira, de modo que a colonização dos riachos pelas espécies de *Astyanax sp.* analisadas se deu, ao menos no Estado de São Paulo, do interior para o litoral.

Entre as espécies analisadas de *Astyanax sp.* e *Serrapinnus notomelas*, estima-se que a separação tenha ocorrido há 26,87 milhões de anos.

4.4. Análise populacional

4.4.1. Distâncias

Para cada espécie calculou-se a distância genética entre e dentro de suas populações. Em *A. fasciatus* a distância dentro da população de Rio Claro é de aproximadamente (\sim) 0.5% e dentro da população de Jaíba-MG é de \sim 0.1%. Entre estas duas a distância genética é de \sim 1,6%. Dentro do Clado I (analisado como uma espécie) considerou-se os indivíduos de Rio Claro como uma população e os de Bauru como outra, independentemente se eles foram classificados previamente como *A. paranae* ou *A. bockmanni*, uma vez que a divergência genética dentro do clado é baixa ($0,33 \pm 0,27\%$). Assim a distância genética entre estas populações é de \sim 0,4%. Dentro da população de Rio Claro a divergência é de \sim 0.3% e de Bauru \sim 0.4%. No Clado II considerou-se como uma espécie todos os indivíduos que não eram *A. scabripinnis*, ou seja, os indivíduos de *A. paranae* e *A. bockmanni* (também devido à baixa divergência genética encontrada dentro do grupo - \sim 0,53%). As distâncias calculadas foram: \sim 0,4% entre Santo André e Rio Claro, Bauru e Rio Claro e Bauru e Santo André; e de \sim 0,7% entre Rio Claro e Botucatu, Santo André e Botucatu e Bauru e Botucatu, mostrando uma maior proximidade entre as populações de Rio Claro, Santo André e Bauru (0,4% de divergência dentro do grupo formado por essas três populações, comparado com 0,53% entre todos os indivíduos do grupo) do que da população de Botucatu (com 0% de divergência dentro do grupo).

Devido à dificuldade de classificação dos indivíduos de *A. paranae* e *A. bockmanni* (evidenciado pela formação de dois clados contendo as duas espécies juntas), calculou-se a

distância genética entre esses clados (novamente com exceção dos indivíduos de *A. scabripinnis*) somente para os indivíduos que ocorrem em simpatria, para verificar se há em cada local de coleta estruturação populacional dos grupos evidenciados pelos clados. Desta forma calculou-se a distância somente para os indivíduos de Rio Claro e Bauru.

Para efeitos de análise as distâncias foram calculadas entre os clados em simpatria nas duas localidades e em alopatria (Tabela 7).

Tabela 7: Distâncias entre os indivíduos dos clados I e II* de Rio Claro e de Bauru. * com exceção dos indivíduos de *A. scabripinnis*. Em destaque as distâncias entre os clados em populações em simpatria (em negrito) e em populações em alopatria (sublinhado).

		Bauru		Rio Claro	
		Clado II*	Clado I	Clado I	Clado II*
Bauru	Clado II*	<i>00.00±0.00</i>	/	/	/
	Clado I	02.15±0.09	<i>00.61±0.53</i>	/	/
Rio Claro	Clado I	<u>02.22±0.11</u>	00.42±0.30	<i>00.22±0.26</i>	/
	Clado II*	00.55±0.00	<u>02.27±0.21</u>	02.22±0.12	<i>00.00±0.00</i>

Dentro de cada clado não houve divergência significativa entre os indivíduos, mesmo estes pertencendo a localidades distintas (0,42±0.3% de divergência dentro do Clado I e 0,55% dentro do Clado II*). mostrando que a distância geográfica não interrompeu o fluxo gênico entre os indivíduos do mesmo clado. As distâncias entre os dois clados são consideráveis tanto em condições de simpatria (~ de 2.15±0.09 a 2.22±0.12%) quanto de alopatria (de 2.22±0.11 a 2.27±0.21%).

4.4.2. Filogeografia

O programa TCS (CLEMENT et al, 2000) demonstrou a existência de 38 haplótipos organizados em cinco redes (Figuras 11, 12, 13 e 14) entre todas as populações de todas as espécies de *Astyanax* analisadas (Tabela 1). A maior parte (73,7%) dos haplótipos encontrados são exclusivos de um único indivíduo. Em algumas populações houve um único haplótipo compartilhado entre todos os indivíduos (haplótipos do Clado II – exceto *A. scabripinnis* - de Bauru e Botucatu), enquanto que em outras cada indivíduo apresentou um haplótipo diferente (Clado II* em Rio Claro e Santo André e *Astyanax paranae* em Castro).

A primeira rede de haplótipos é formada pelos indivíduos do Clado I (Figura 11). O haplótipo I-1 está representado por 25% dos indivíduos e o I-13, segundo mais comum com 17,85% de ocorrência, é compartilhado entre indivíduos de Rio Claro e de Bauru. O haplótipo mais primitivo é o I-11, representado por um indivíduo de Rio Claro. Este se diferencia de I-1 por apenas uma base nucleotídica.

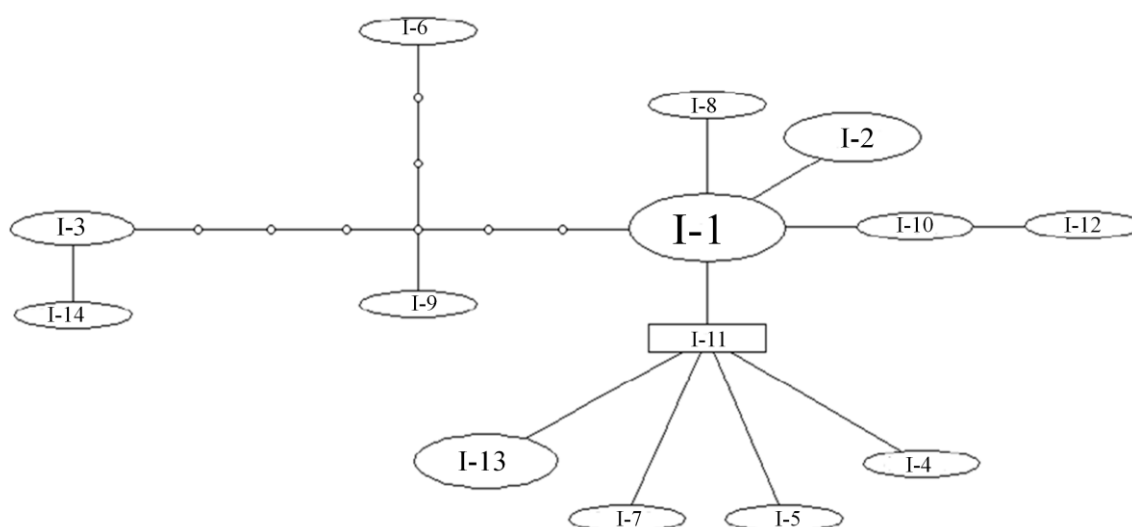


Figura 11: Rede de haplótipos formada pelos indivíduos do Clado I, gerada pelo TCS. Os haplótipos são representados pelo retângulo e pelas formas ovais, com seus respectivos nomes. O retângulo representa o haplótipo mais primitivo da rede, do qual os demais teriam se originado. Quanto maior a forma geométrica, maior o número de indivíduos que possuem aquele haplótipo. Os haplótipos ligados entre si possuem apenas um nucleotídeo diferente entre suas sequências. Os pequenos círculos sobre as linhas entre os haplótipos representam haplótipos “perdidos”.

O Clado II formou uma rede de haplótipos com todos os seus indivíduos (Figura 12). O haplótipo II-1, de Botucatu, foi o mais comum (42% dos indivíduos), seguido por II-9, presente em 21% dos indivíduos. *A. scabripinnis* possui dois haplótipos, SCA1 presente em 80% dos indivíduos e SCA2 em 20%. SCA1 é o haplótipo mais primitivo da rede (representado pela forma retangular).

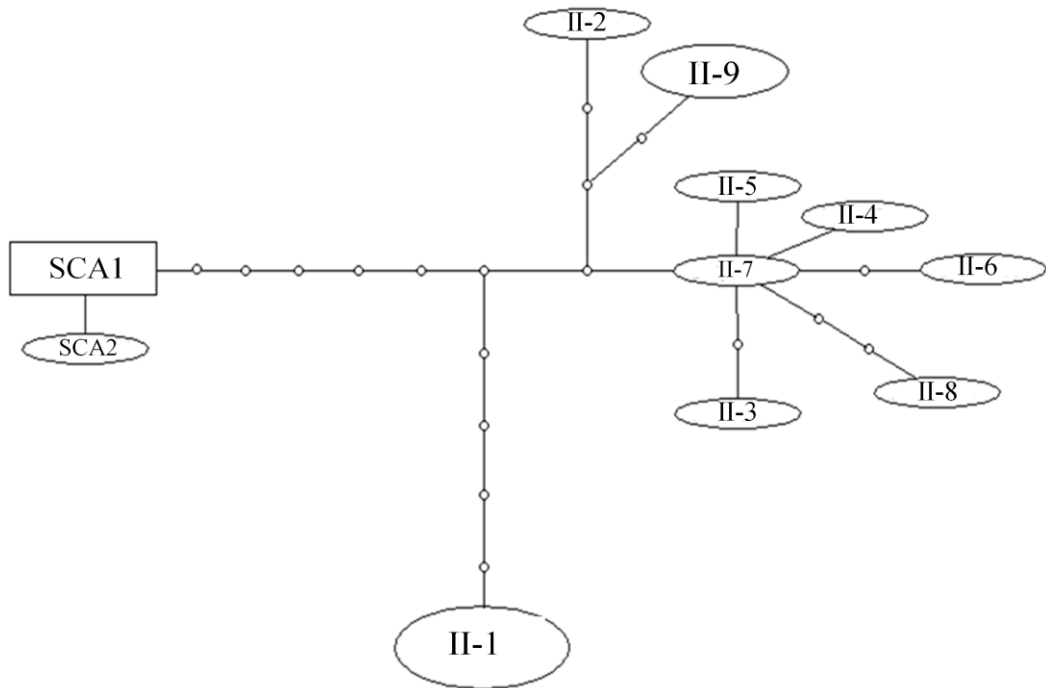


Figura 12: Rede de haplótipos conectando formada pelo Clado II.

O Clado três formou três redes de haplótipos: uma para *A. fasciatus* de Jaíba-MG, uma para *A. fasciatus* de Rio Claro e uma para *A. paranae*. Em *A. fasciatus* a rede de haplótipos com os indivíduos de Jaíba tem o FAS6 como haplótipo mais primitivo a rede com os indivíduos de Rio Claro-SP tem FAS1 como o haplótipo mais primitivo. Com base em 95% de confiança as conexões entre as redes de haplótipos são rompidas quando os grupos possuem mais de 12 mutações entre si.

Com os indivíduos de Rio Claro houve a conexão do indivíduo de *A. biotae*, indicando a proximidade genética dessas duas espécies, que também foi evidenciada pela divergência de $0.83 \pm 0.51\%$ de acordo com a Tabela 6. *A. biotae* possui um único haplótipo por ser representado por apenas um indivíduo. Em *A. fasciatus* os haplótipos FAS5 e FAS6 são os que se repetem (presentes em 22% dos indivíduos cada um), todos os outros são exclusivos de apenas um indivíduo (Figura 13).

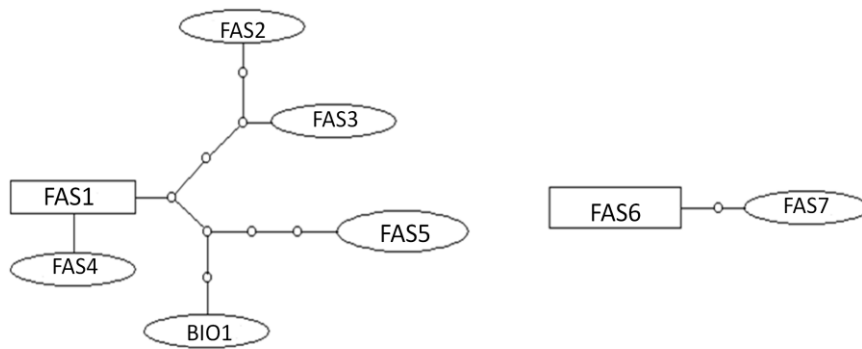


Figura 13: Redes de haplótipos de *A. fasciatus* e *A. biotae*.

Em *A. paranae* cada indivíduo possui um haplótipo diferente e o mais primitivo é o haplótipo PAR3. Este difere-se de PAR5 por apenas uma base nucleotídica (Figura 14). *A. altiparanae* não teve seus haplótipos analisados.

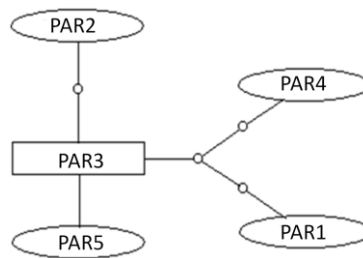


Figura 14: Rede de haplótipos de *A. paranae*.

5. Discussão

5.1. Relações Filogenéticas e História Evolutiva de *Astyanax* sp. na Bacia do Rio Tietê

A pequena diversidade genética existente entre os clados I e II ($2,15 \pm 0,25\%$) e consequentemente sua recente separação (há $\sim 2,69$ Ma) explicam a dificuldade em classificar através de caracteres morfológicos *A. paranae* da Bacia do Tietê e *A. bockmanni* também desta bacia hidrográfica. Dificuldade esta evidenciada pelo agrupamento das duas espécies juntas em um mesmo clado por duas vezes (clados I e II). Porém, apesar de próximos geneticamente os clados I e II podem ser considerados espécies distintas, pois segundo Ornelas-Garcia (2008) para o gene *cyt b* em *Astyanax* valores de divergência entre sequências acima de 2% caracterizam espécies distintas. Desta forma, uma das espécies deve ser *A. bockmanni* e a outra uma nova espécie, que se pensava ser *A. paranae* (ver próximo tópico), uma vez que os indivíduos foram classificados inicialmente como pertencentes a estas duas espécies. O mesmo não acontece entre *A. scabripinnis* e os demais exemplares do Clado II, que possuem divergência genética menor do que 2% ($1,19 \pm 0,53\%$), apesar de *A. scabripinnis* ser uma espécie válida. Isto pode ser explicado pela recente separação do grupo (há $\sim 1,48$ Ma). Se houvesse a ocorrência de *A. scabripinnis* e a espécie do Clado I, ou do Clado II em simpatria provavelmente haveria dificuldade em se separar morfológicamente *A. scabripinnis* dessas outras duas espécies (a distância entre *A. scabripinnis* e a espécie do Clado I também é baixa - $1,52 \pm 0,57\%$). As baixas divergências genéticas encontradas dentro dos clados I e II ($0,33 \pm 0,27$ e $0,66 \pm 0,35\%$, respectivamente) revelam que há fluxo gênico entre os indivíduos pertencentes a cada clado.

O Clado III reuniu exemplares de *A. paranae* (da localidade-tipo), de *A. fasciatus* e de *A. biotae*. Em *Astyanax fasciatus* o agrupamento dos indivíduos de Rio Claro mais os de Jaíba-MG em um mesmo clado reforça o seu monofiletismo, não havendo problemas com a classificação desta espécie. O agrupamento de *A. biotae* com *A. fasciatus* (Figuras 7, 8 e 9) mostra que a distância genética entre as duas espécies é muito pequena ($0,83 \pm 0,51\%$), porém

isso também pode ser explicado pela recente separação entre elas, há 1,03 milhão de anos. *Astyanax paranae* da localidade-tipo se revelou mais próximo de *A. fasciatus* ($1.91 \pm 0.27\%$ de divergência) do que das espécies dos Clados I e II (4.54 ± 0.13 e $4.45 \pm 0.17\%$, respectivamente), o que revela que os indivíduos agrupados nestes clados não podem pertencer a *A. paranae*, uma vez que a distância genética entre eles e *A. paranae* da localidade-tipo é muito alta (Tabela 5). Consequentemente o tempo de divergência entre *A. paranae* da localidade-tipo e as espécies dos clados I e II também é grande, sendo de 5,67 Ma para o Clado I e de 5,56 Ma para o Clado II. Desta forma acredita-se que, na Bacia do Rio Tietê não ocorra a espécie *A. paranae*. Reafirma-se aqui a eficiência da taxonomia molecular em separar grupos em que os caracteres morfológicos não são eficientes para diagnosticar a espécie (VRIJENHOEK, 1998; APOSTOLIDIS et al, 2008).

Dentro do Clado III a alta divergência entre as sequências ($1,33 \pm 0,70\%$) poderia ser explicada pelo fato de que ele agrupou três espécies distintas, porém esse mesmo motivo não se aplica ao Clado IV, que é $1,18 \pm 0,78\%$ divergente entre seus indivíduos.

O último clado (IV), formado exclusivamente por *A. altiparanae* é o mais distante dos outros, tendo se separado primeiro de todo o grupo (há ~23 milhões de anos) (Figura 10). Consequentemente apresenta as maiores taxas de distância genética com os outros clados e espécies (Tabelas 6 e 5, respectivamente).

Desta forma na Bacia do Rio Tietê *A. altiparanae* se diversificou inicialmente do restante do grupo, que mais tarde originou *A. fasciatus*, *A. bockmanni* e mais uma espécie de *Astyanax* não identificada (a que se pensava ser *A. paranae*) nesta bacia e ainda *A. scabripinnis*, que colonizou a bacia costeira.

5.2. Análises Populacionais e Filogeografia comparativa de *Astyanax paranae* e demais espécies do gênero.

As análises filogeográficas demonstraram que nenhum haplótipo é compartilhado entre os clados, porém há um haplótipo compartilhado entre duas populações: o haplótipo I-13 está presente em um indivíduo inicialmente identificado como *A. paranae*, de Rio Claro, e em um identificado como *A. bockmanni*, de Bauru. Este fato indica que além de os indivíduos do Clado I pertencerem à mesma espécie, as populações mantêm fluxo gênico, apesar da distância geográfica. Apesar de o haplótipo mais antigo ser indicado, não se pode afirmar com

certeza que a espécie teria se originado em Rio Claro e migrado para Bauru, uma vez que a inclusão de mais amostras na rede de haplótipos poderia mudar esta situação.

No Clado II as distâncias genéticas entre as populações da espécie que não *A. scabripinnis* (Botucatu, Rio Claro, Sano André e Bauru) não estruturam populações muito distintas (AVISE, 1987) (variando entre ~0,4 a ~0,7% de divergência). O agrupamento de *A. scabripinnis* e a outra espécie no mesmo clado, a conexão entre os haplótipos destas duas espécies e a baixa divergência genética entre elas (descrita no item anterior) revela maior proximidade entre estas duas espécies do que entre *A. scabripinnis* e a espécie do Clado I. Considerando-se que (nos cladogramas I e II) uma das espécies deve ser *A. bockmanni* e a outra se pensava ser *A. paranae*, e que esta última representa o que se chamava de *A. scabripinnis* para a Bacia do Alto Paraná, estes dados sugerem que a espécie do Clado II seria uma nova espécie (e não *A. paranae*, como se pensava) pelo fato de ser mais próxima de *A. scabripinnis* do que a espécie do Clado I. Desta forma *A. bockmanni* deve estar representada pelo Clado I, uma vez que não tem relações com o complexo *scabripinnis*. Porém apesar de próximas *A. scabripinnis* e a nova espécie possuem vários haplótipos “perdidos” entre seus haplótipos (Figura 12), o que reforça que o fluxo gênico entre elas foi interrompido, reforçando se tratar de espécies distintas.

Apesar de *A. fasciatus* ser monofilético (Clado III) houve agrupamento geográfico entre as populações – nenhum haplótipo é compartilhado entre elas, além de suas redes não se interligarem – e a distância genética entre as duas populações é alta (~1,6%) (AVISE, 1987), podendo sugerir que não haja mais fluxo gênico entre elas e que elas estejam se encaminhando para um processo de especiação. Desta forma sugere-se que mais estudos sobre esta espécie sejam feitos entre a Bacia do São Francisco e a Bacia do Alto Rio Paraná, para se elucidar as relações filogenéticas entre elas.

Na Figura 15 tem-se a árvore-resumo dos resultados encontrados. Cada espécie tem a mesma cor de destaque na árvore e nas redes de haplótipos. *A. altiparanae* não teve seus haplótipos elaborados. O haplótipo de *S. notonelas*, único por se tratar de apenas um indivíduo, também não se encontra na figura. Observando-se as localizações das espécies na árvore-resumo e suas respectivas redes de haplótipos fica evidente que *A. paranae* da localidade-tipo e as duas espécies representadas pelos cladogramas I (possivelmente *A. bockmanni*) e II (*Astyanax sp.*, espécie não descrita) não formam um grupo monofilético, restringindo a distribuição de *A. paranae*, não havendo sua ocorrência na Bacia do Rio Tietê.

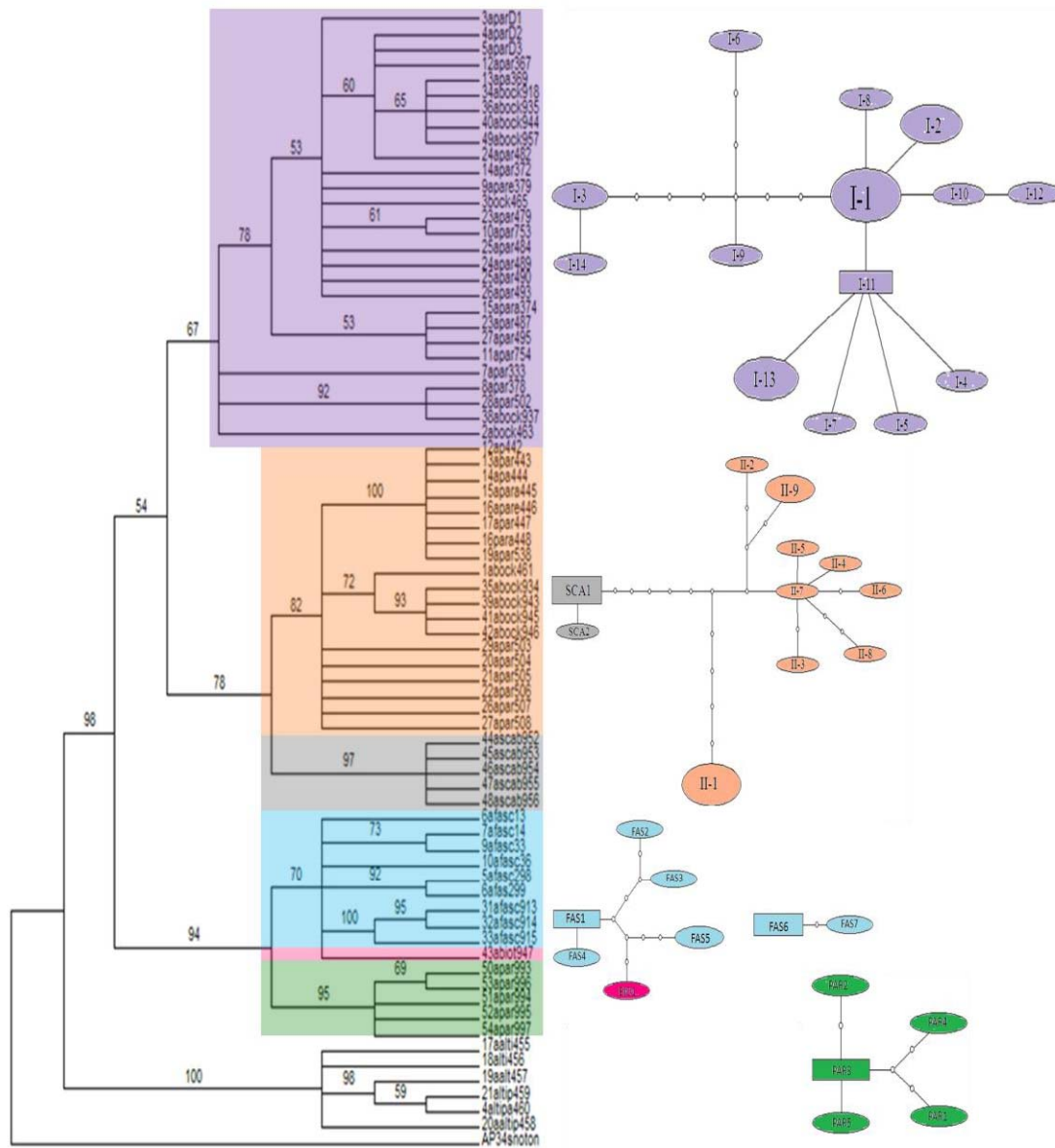


Figura 15: Árvore-resumo, pelo método de NJ, destacando com as mesmas cores cada espécie e seus respectivos haplótipos. Em ordem, de cima para baixo: em lilás: *Astyanax bockmanni**; em laranja: *Astyanax sp**; em cinza: *A. scabripinnis*; em azul: *A. fasciatus*; em rosa: *A. biotae*; em verde: *A. paranae*. *classificações sugeridas.

6. Conclusão

O objetivo inicial de se estabelecer as relações filogeográficas entre diferentes populações de *Astyanax paranae* residentes na Bacia do Rio Tietê não pode ser alcançado uma vez que a espécie encontrada nesta bacia não se trata de *A. paranae*. Porém a filogeografia das espécies de *Astyanax* aqui encontradas mostra que não há estruturação populacional entre elas. A estruturação encontrada em *A. fasciatus* se dá entre uma população da Bacia do Tietê e uma da Bacia do São Francisco.

Apesar de não ter alcançado o objetivo inicial este trabalho teve descobertas possíveis somente através da genética molecular, como a constatação de que há uma espécie de *Astyanax* não identificada na Bacia do Rio Tietê, reafirmando ser necessário um amplo estudo taxonômico e sistemático no complexo *scabripinnis*, para revelar as relações filogenéticas entre estas espécies e identificar novas. Verificou-se também a dificuldade em se separar, com base somente em caracteres morfológicos esta nova espécie e *A. bockmanni*.

Por último verificou-se que a expansão das espécies de *Astyanax* analisadas, ao menos para a região da Bacia do Rio Tietê, se deu dos riachos do cristalino superior para o costeiro (do interior do continente para o litoral), sendo a espécie mais antiga representada por *A. altiparanae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIHITO, I. A. et al. **Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome *b* genes.** *Gene* v.259, p5–15. 2000. Apud 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).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, [S.l.] v.37, p.700–720. 2005.
- ALMEIDA F. F. M. et al. **Mapa Geomorfológico do Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. 1981. Escala 1:500 000. (Monografias 6: Vol. I Texto 126 p; Vol. II mapa) apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.
- ALMEIDA, F. F. M. – **Grupo São Bento. In: Geologia do Estado de São Paulo.** p85-101. Instituto de Geografia e Geologia. São Paulo.1964. apud ESPINDOLA, C. R. **Pedogênese em áreas basálticas de reverso de cuevas no médio curso do Rio Tietê.** 1979. 212p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 1979.
- 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*. [S.l.] In Press.
- APOSTOLIDIS, A. P. et al. **Reliable and rapid discrimination of congeneric species by mtDNA SNP analysis by multiplex PCR: application on three *Trachurus* and two *Mullus* fish species as model cases.** *Hydrobiologia*, [S.l.] v.614, p.401–404, ago. 2008.
- AVISE, J. C. et al. **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, [S.l.], v. 18, p 489-522, nov. 1987.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species.** Harvard University Press, London. 2000.
- BAIN, M. B.; FINN, J. T.; BOOKE H. E. **Streamflow regulation and fish community structure.** *Ecology*, [S.l.] v.69, n.2, p.382-392. 1988.
- BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.
- 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.

BERTACO, V.; GARUTTI, V. **New *Astyanax* from the upper rio tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae)**. Neotropical Ichthyology, v.5, n.1, p25-30. 2007.

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, p53-60. 2006.

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**. Ichthyol. Explor. Freshwaters, v.12, n.3, p221-234. 2001.

BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. **Family Heptapteridae**. pp, 406 – 431 in **Check list of the freshwater fishes of South America**, edited by Reis, R.E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. Edipucrs, Porto Alegre, RS. 2003 apud PERDICES, A. et al. **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America**. Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.25, p172-189. 2002.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias: com chaves de identificação de peixes da Bacia do São Francisco**. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 1984, 143p apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento**. 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

BUHAY, J. E.; CRANDALL, K. A. **Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes**. Molecular Ecology, v. 14, p.4259–4273, 2005.

BURBRINK, F. T. **Inferring the phylogenetic position of *Boa constrictor* among the *Boinae***. Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v. 34 p. 167–180, 2005.

CÂMARA, I. G. 1991. **Plano de ação para a Mata Atlântica:roteiro para a conservação de sua biodiversidade**. Caderno nº4. Fundação SOS Mata Atlântica. São Paulo. 1996 Apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento**. 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

CASTRO, R. M. C. et al. **Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil**. Biota Neotropica, v.3, n.1, 2003.

CASTRO, R. M. C. et al. **Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil**. Biota Neotropica, v.4, n.1, 2004.

CASTRO M. R. et al. **Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil**. Ichthyol. Explor. Freshwaters, v.6, n.3, p.193-214. 2005 apud 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. [S.l.] In Press.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies.** Molecular Ecology, v.9, n.10, p1657-1660. 2000.

COLANGELO, P. et al. **Mitochondrial phylogeny reveals differential modes of chromosomal evolution in the genus *Tatera* (Rodentia: Gerbillinae) in Africa.** Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.35, p.556–568. 2005.

COURTENAY, W. R. et al. **Comparative status of fishes along the course of pluvial White River, Nevada.** The South. Naturalist, [S.l.] v.30, n.4, p.503-524. 1985. apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

DERGAM, J. A. et al. **Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil.** Genetics and Molecular Biology, v.25, n.4, p379-387. 2002.

EIGENMANN, C. H. **The American Characidae.** Part 1. Memoirs of Museum of Comparative Zoology, v.43, p.1-102. 1917.

EIGENMANN, C. H. **The American Characidae.** Part 3. Memoirs of Museum of Comparative Zoology. v.43, p208-310. 1921.

ESCHMEYER, W. N. **Catalog of fishes: Updated database version of June 2007.** *FishBase* 2007 apud ORNELAS-GARCIA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O. e DOADRIO, I. **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies.** BioMed Central Evolutionary Biology, v.8, p340. 2008.

ESPINDOLA, C. R. **Pedogênese em áreas basálticas de reverso de cuevas no médio curso do Rio Tietê.** 1979. 212p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 1979.

FALK, T. M. et al. **Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory.** Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.27, p81–92. 2003.

FARIAS, I. P. et al. **The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes.** Journal of Molecular Evolution, v.53, p89–103. 2001.

FERNANDO, C. H. & HOLCIK J. **Fish in reservoirs.** Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, [S.l.] v.76, n.2, p.149-167. 1991.

- FROUFE, E. et al. **Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH-1) divergence in Hucho taimen (Pallas) across four Siberian river basins.** Journal of Fish Biology, v.67, p1040–1053. 2005.
- GRAZZIOTIN, F. G. et al. **Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest.** Molecular Ecology. 2006.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser., v.41, p95-98. 1999.
- 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).** Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.37, p.700–720. 2005.
- HUBERT N. et al. **Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna.** Molecular Ecology, v.16, p.2115-2136. 2007.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. R. **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees.** Bioinformatics, v.17, p.754–755. 2001.
- LAVOUÉ, S. **Phylogenetic relationships of mormyrid electric fishes (Mormyridae; Teleostei) inferred from cytochrome *b* sequences.** Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.14, p1–10. 2000.
- MALABARBA, L.R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Ed.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes.** EDIPUCRS. Porto Alegre. 1998.
- MELO, F. A. G.; BUCKUP, P. A. ***Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aenus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes).** Neotropical Ichthyology, v.4, n.1, p.45-52. 2006.
- MEYER, A. **Evolution of mitochondrial DNA in fishes.** In: Hochachka, P. W. & Mommsen (Eds). Biochemistry and molecular biology of fishes, v.2,. Elsevier Science Publishers. p1-38 1993 apud TERCENIO, M. A. **Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lesbiansinidae) da bacia do rio Negro.** 2009. 56f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. **Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).** Hereditas, v.127, p.249-253. 1997.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. **Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implication on the diversification of Neotropical ichthyofauna.** Molecular Ecology, v.12, p.1855-1867. 2003.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. ***Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex.** Brazilian Journal of Genetics, v.14, p.331-357. 1991.

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, [S.l.] v.24, n.4, p.711-722. 2009.

MOYLE, B. et al. **Distribution and Ecology of Stream Fishes of the Sacramento-S.Joaquim Drainage System, California.** Univ. Calif. Zoology, v.115, p.256. 1982 apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

ORFEU, O.; STEVAUX, J. C. **Hydraulic and morphological characteristics of middle and upper reaches of the Paraná river (Argentina and Brazil).** Geomorphology, v.44, p.309-322, may. 2002.

ORNELAS-GARCIA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies.** BioMed Central Evolutionary Biology, v.8, p340. 2008.

PERDICES, A. et al. **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.25, p.172-189. 2002.

PONÇANO, W. L. et al. **Mapa Geomorfológico do Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. 1981. Escala 1:1 000 000. (Monografias 5: Vol. I Texto 94p. Vol. II mapa) apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

POSADA D.; CRANDALL K. A. **Modeltest: testing the model of DNA substitution.** Bioinformatics, v.14, p.817-818. 1998.

PURDOM, C.E. **Genetics and Fish breeding.** Chapman and Hall (Ed). London. 1993 apud 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. [S.l.] In Press.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South America,** Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

ROCHA, A. A. 1991. **Do Lendário Anhembi ao Poluído Tietê.** EDUSP, São Paulo, 75p. apud BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido à poluição e ao represamento.** 1997. 115f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** v.3, Cold Spring Harbor Laboratory Publisher. 2001

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae)**. Swedish Museum of Natural History, Stockholm 1996. apud PERDICES, A. et al. **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America**. Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.25, p.172-189. 2002.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. **Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers**. Molecular Ecology, v.10, n.2, p.407-417. 2001.

SOUZA, C. R. G. et al. (Ed.) **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005, 382p.

SOUZA FILHO, E. E. **Aspectos da geologia e estratigrafia dos depósitos sedimentares do Rio Paraná entre Porto Primavera (MS) e Guaíra (PR)**. Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado). 214p. São Paulo. 1993. apud SOUZA, C. R. G. et al. (Ed.) **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005, 382p.

STEVAUX, J. C. **The upper Paraná River (Brasil): geomorphology, sedimentology and paleoclimatology**. Quaternary International, v.21, p143-161. 1994.

STEVAUX, J. C. **O Paraná: geomorfogênese, sedimentação e evolução quaternária do seu curso superior (região de Porto Rico, PR)**. 242p. Tese (Doutorado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993 apud SOUZA, C. R. G. et al. (Ed.) **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005, 382p.

STEVAUX, J. C. **Climatic events during the Late Pleistocene and Holocene in the upper Paraná River: correlation with NE Argentina and South Central Brazil**. Quaternary International, v.72, p73-85. 2000 apud SOUZA, C. R. G. et al. (Ed.) **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005, 382p.

STEVAUX, J. C. & SANTOS, M. L. **Paleohydrological changes in the upper Paraná river, Brazil, during the late Quaternary: a facies approach**. 1998, apud SOUZA, C. R. G. et al. (Ed.) **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005, 382p.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V. H.; WILKENS, H. **Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome *b* sequence data**. Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.l.] v.33, p.469-481. 2004.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4**. Sunderland: Sinauer Associates. 2002.

TAMURA, K. et al. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. Molecular Biology and Evolution, v.24, p.1596-1599, 2007.

TERENCIO, M. A. **Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lesbiansinidae) da bacia do rio Negro**. 2009. 56f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

VRIJENHOEK, R.C. **Conservation genetics of freshwater fish**. Journal of Fish Biology, v.53, p394-412. 1998.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. **Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes)**. p161–170. 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. et al. **Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae)**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, [S.l.] v.44, p291-307. 2007.

XIA, X.; XIE, Z. **DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution**. *Journal of Heredity*, v.92, p371-373. 2001.

XIA, X. **Data analysis in molecular biology and evolution**. Boston: Kluwer Academic publishers.. 2000. 276p.