
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**EVIDÊNCIAS MOLECULARES DOS PADRÕES EVOLUTIVOS E
FILOGEOGRÁFICOS DE POPULAÇÕES DE *Astyanax paranae*
(PISCES: CHARACIDAE) COM BASE EM CARACTERES DO
DNA MITOCONDRIAL**

MARIA EDUARDA MARRETA

The background of the lower half of the page features a large, abstract geometric pattern composed of various shades of blue and white, creating a sense of depth and movement.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2011

MARIA EDUARDA MARRETA

**EVIDÊNCIAS MOLECULARES DOS PADRÕES EVOLUTIVOS E
FILOGEOGRÁFICOS DE POPULAÇÕES DE *Astyanax paranae*
(PISCES: CHARACIDAE) COM BASE EM CARACTERES DO DNA
MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Dr. Anderson Luís Alves

**Rio Claro
2011**

597 Marreta, Maria Eduarda
M358e Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de
populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em
caracteres do DNA mitocondrial. / Maria Eduarda Marreta. - Rio Claro :
[s.n.], 2011
 95 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
 Orientador: Anderson Luis Alves

 1. Peixe. 2. Genética. 3. ATP sintetase 6/8. 4. Filogenia. 5.
Filogeografia. 6. Alto rio Paraná. 7. RFLP. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

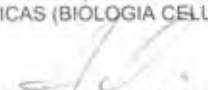
TÍTULO: EVIDÊNCIAS MOLECULARES DOS PADRÕES EVOLUTIVOS E FILOGEOGRÁFICOS DE POPULAÇÕES DE *Astynax paranae* (PISCES: CHARACIDAE) COM BASE EM CARACTERES DO DNA MITOCONDRIAL

AUTORA: MARIA EDUARDA MARRETA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDERSON LUIS ALVES

ORIENTADORA: Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANDERSON LUIS ALVES

Depto de Biologia - Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu


Prof. Dr. CLAUDIO HENRIQUE ZAWADZKI

Depto. de Biologia - Universidade Estadual de Maringá

Data da realização: 24 de fevereiro de 2011.

|

**Dedico este trabalho aos amores da minha
vida: meu noivo, minha mãe e minha irmã.**

**“Aprenda com o ontem, viva o hoje e
tenha esperança para o amanhã”.
(Albert Einstein)**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro, em especial a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia.

Ao Laboratório de Genética de Peixes pela estrutura doada para a realização dos experimentos e consequente aprimoramento dos meus conhecimentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira fornecida para que este projeto se tornasse uma realidade.

Ao meu orientador Dr. Anderson Luís Alves pelos ensinamentos concedidos e pela confiança e oportunidade a mim dada para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Patrícia P. Parise-Maltempi pela amizade, dicas e ajuda concedida durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos Doutores: Cláudio Oliveira (UNESP, Botucatu/SP), Fábio Porto-Foresti (UNESP, Bauru/SP), Vinícius Abilhoa (MHNCI, Curitiba/PR), Carla Pavanelli (UEM, Maringá/PR), Cláudio Zawadzki (UEM, Maringá/PR) e Sandra Morelli (UFU, Uberlândia/MG) pela doação de exemplares.

Ao mestrando Ricardo Britzke (UNESP, Botucatu/SP) e ao Dr. Oscar Shibatta (UEL, Londrina/PR) pela identificação de alguns exemplares.

Aos meus amigos de laboratório, em especial, Play, Josi, Jacque, Edson, Diovani, Rafael, Dani Giratto, Débora, Franco, Thiago e Simone por compartilharem os momentos de angústia e realizações durante a execução deste estudo e por tornarem o ambiente tão prazeroso.

Ao meu noivo, Ronaldo, pelo companheirismo e apoio, além de estar sempre disposto a me ajudar nas horas difíceis e me fazer rir. Obrigada por proporcionar momentos tão especiais nesses anos juntos.

À minha mãe Angelita e minha irmã Fernanda, pelo esforço e dedicação em todos esses anos, fazendo de nós uma família de mulheres fortes.

Meu muito obrigado a todos aqueles que de alguma forma foram decisivos para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Astyanax paranae é uma espécie de peixe de pequeno porte que habita cabeceiras de riachos, resultando no isolamento geográfico entre as populações. Sendo considerada endêmica da bacia do Alto rio Paraná, recentemente foi elevada a espécie, deixando de ser considerada uma subespécie de *A. scabripinnis*, sendo a única espécie do “complexo *scabripinnis*” presente nessa bacia. Os raros relatos de dados moleculares populacionais e a ausência de uma análise filogeográfica consistente para populações de *A. paranae*, aliado as evidências citogenéticas e morfológicas de que essa espécie não represente uma unidade monofilética, reforçam a necessidade de um amplo estudo evolutivo e biogeográfico na bacia do Alto rio Paraná, reconhecidamente uma área de endemismo ictiológico. Nesse sentido, caracterizou-se a variabilidade genética em populações de *A. paranae* a fim de se estabelecer as relações filogenéticas e filogeográficas entre as linhagens de DNA na bacia do Alto rio Paraná, através da identificação dos haplótipos do mtDNA a partir da sequência completa do gene da ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8), num total de 842pb, bem como a caracterização das quatro espécies mais abundantes dessa bacia por PCR-RFLP. As análises filogenéticas foram realizadas com 88 exemplares de *A. paranae* além de 70 exemplares de espécies relacionadas do gênero, num total de 158 indivíduos analisados. Como grupo externo foram incluídos exemplares de *Serrapinnus* e *Bryconamericus*. As topologias foram geradas a partir dos métodos de *Neighbor Joining*, Máxima Parcimônia, no programa PAUP 4.0b10, e Inferência Bayesiana, no programa Mr. Bayes, enquanto a rede de haplótipo foi gerada no programa TCS. O relógio molecular foi utilizado para estimar o tempo de divergência entre as espécies/linhagens adotando a taxa de 1.3%/Ma para o gene ATPase 6/8. Tanto as análises filogenéticas como as filogeográficas suportam a hipótese de que *A. paranae* não forma uma unidade monofilética no Alto rio Paraná, sendo possível identificar sete distintas linhagens, das quais cinco possivelmente representam novas espécies. As relações filogenéticas e de filogeografia comparativa entre as linhagens de *A. paranae* e as demais espécies analisadas do gênero sustentam a proposta da hipótese de colonização de *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná a partir da bacia do Atlântico Leste. A utilização de fragmentos de restrição, empregada de modo complementar, foi capaz de identificar as espécies de *Astyanax* de maior ocorrência na bacia a partir da análise combinada das endonucleases. Portanto, o presente trabalho mostrou a importância na utilização das análises moleculares a fim de se obter uma correta abordagem das relações filogenéticas e filogeográficas e sugere que apenas um estudo combinado entre taxonomia e biologia molecular poderá recuperar a história evolutiva das espécies de *Astyanax*.

Palavras-chave: *Astyanax*. Filogenia. Filogeografia. Alto rio Paraná. ATPase 6/8. PCR-RFLP.

ABSTRACT

Astyanax paranae is small sized species of fish that inhabit small headwater streams, resulting in geographical isolation between populations. Being considered endemic to the Upper Paraná River basin it was considered a species and no longer a subspecies of *A. scabripinnis*, being the only one species of the “*scabripinnis* complex” present in this basin. The few reports of molecular population data and the absence of a consistent phylogeographic analysis for populations of *A. paranae*, combined to cytogenetic and morphological evidences that this species does not represent a monophyletic unit, reinforce the need of a wide study of evolution and biogeography in the Upper Paraná River basin, a known area of ichthyological endemism. The genetic variability in populations of *A. paranae* was characterized in order to establish phylogenetic and phylogeographic relationships between mtDNA lineages in the Upper Paraná River basin, through the identification of mtDNA haplotypes from the complete sequence of the gene ATP synthase 6 and 8 (ATPase 6/8), a total of 842bp, and the characterization of the four most abundant species in this basin by PCR-RFLP. Phylogenetic analyses were made in 88 specimens of *A. paranae* and also in 70 of related species of the genus, resulting in 158 individuals analyzed. As outgroup, were included samples of *Serrapinnus* and *Bryconamericus*. The topologies were generated from the methods of Neighbor Joining, Maximum Parsimony and Bayesian Inference in the program PAUP 4.0b10, while the haplotype network was generated in the program TCS. The molecular clock was used to estimate time of divergence between species/lineage using the rate of 1.3%/Ma for the ATPase 6/8 gene. Both phylogenetic and phylogeographic analysis support the hypothesis that *A. paranae* does not form a monophyletic unit in the Upper Paraná River basin, being possible to identify seven distinct lineages, five of which possibly represent new species. Phylogenetic relationships and comparative phylogeography between the lineages of *A. paranae* and the other species of the genus supports the hypothesis of colonization of *Astyanax* in the Upper Paraná River basin from the eastern Atlantic. The use of restriction fragment employed in a complementary manner, was able to identify the most occurrent species of *Astyanax* in the basin through the combined analysis of the endonucleases. Therefore, this study showed the importance of the use of molecular analysis in order to obtain a correct approach to the phylogenetic and phylogeographical relationships and suggests that only a combined study of taxonomy and molecular biology can recover the evolutionary history of *Astyanax* species.

Keywords: *Astyanax*. Phylogeny. Phylogeography. Upper Paraná River. ATPase 6/8. PCR-RFLP.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Os peixes Neotropicais de pequeno porte	9
1.2. Estudos evolutivos e de filogeografia em peixes Neotropicais	11
1.3. Characiformes e a família Characidae.....	13
1.4. <i>Astyanax paranae</i> e as relações taxonômicas com o complexo <i>scabripinnis</i>	15
1.5. A bacia do Alto rio Paraná como área de estudo.....	16
1.6. Enfoque genético em populações de <i>Astyanax paranae</i>	18
1.7. Justificativa.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. MATERIAIS	21
3.1.1. Análises filogenéticas e filogeográficas	21
3.1.2. Análises de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).....	27
3.2. MÉTODOS.....	27
3.2.1. Análises filogenéticas e filogeográficas	27
3.2.1.1. Extração de DNA.....	27
3.2.1.2. Amplificação do DNA.....	29
3.2.1.3. Limpeza do produto de PCR para sequenciamento.....	30
3.2.1.4. Análise das sequências	30
3.2.2. Análises de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).....	32
3.2.2.1. Digestão enzimática.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
ARTIGO 1 – Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de <i>Astyanax paranae</i> (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial.....	34
ARTIGO 2 – Identificação molecular de quatro espécies de <i>Astyanax</i> (Teleostei: Characidae) com base em PCR-RFLP.....	75
5. CONCLUSÕES	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os peixes Neotropicais de pequeno porte

Dois terços do nosso planeta são cobertos por água e grande parte destes ambientes fornece suporte para a vida dos peixes que correspondem à cerca de 50% dos vertebrados (NELSON, 1994). Merece destaque especial a região Neotropical, uma vez que a fauna de peixes de água doce presente nesse local é conhecida por sua grande riqueza e, de acordo com Reis e colaboradores (2003), abriga 71 famílias e 4.475 espécies descritas. Apesar desse número já ser expressivo, uma estimativa realizada no mesmo estudo, sugeriu a existência de aproximadamente 6.000 espécies habitando rios e lagos dessa mesma região, isso se incluídas novas espécies já reconhecidas por especialistas, porém ainda não descritas.

Esses dados são bastante imprecisos, de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando que o número estimado de peixes de água doce para o mundo todo seja cerca de 13.000 espécies. A diferença entre o número de espécies descritas e o verdadeiro número de espécies faz muitos estudos, incluindo os de citogenética e genética, serem bastante difíceis, uma vez que várias espécies ainda não possuem um nome científico (OLIVEIRA et al., 2009), o que impossibilita uma correta abordagem acerca da diversidade de espécies presentes na região Neotropical.

Os peixes apresentam uma considerável capacidade de adaptação biológica a diversos tipos de habitat, com grande variedade ambiental, espacial e temporal, sendo possível observar as mais impressionantes especializações de morfologia, fisiologia e comportamento (PURDOM, 1993). Estes organismos são interessantes também por apresentarem uma considerável importância para a sobrevivência do homem, na forma de alimentos e na geração de renda, portanto, estudos enfocando diferentes aspectos de sua vida são necessários.

Embora os peixes representem um grupo altamente importante para a manutenção da diversidade biológica e serem fortemente utilizados como recurso pesqueiro, os ambientes naturais têm sido largamente afetados pelo crescimento dos impactos provocados por ações humanas, o que tem levado a destruição, fragmentação e mudanças nesses ambientes, promovendo a redução ou extinção de vários organismos (ERLICH, 1988; WILSON, 1988; AVISE, 1996; OLIVEIRA et al., 2009).

Nesse sentido, o conhecimento detalhado de aspectos da biologia e genética dos peixes torna-se uma condição fundamental para a exploração e o manejo racional dos estoques pesqueiros e para a conservação de peixes de pequeno porte, a chamada ictiofauna de riachos.

Os peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15 cm de comprimento, correspondem à cerca de 50% das espécies de peixes de água doce descritas na América do Sul e mostram um elevado grau de endemismo (CASTRO et al., 2003). Apresentam distribuição geográfica restrita e pouco ou nenhum valor comercial e, por isso, são bem menos estudadas do que as espécies de grande porte (CASTRO, 1999). Essas espécies são dependentes da mata ciliar para a alimentação, abrigo e reprodução e, por isso, estão ameaçadas por atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas associados a atividades agrícolas intensivas (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2005).

Considerando que a variação genética é um meio pelo qual uma determinada espécie reage e se adapta a um ambiente em mudança e que recursos genéticos podem ser perdidos como um resultado direto da extinção de espécies, o que é irreversível, ou pela redução da variabilidade genética intraespecífica (OLIVEIRA et al., 2009), estudos sobre a estrutura genética de populações são um aspecto importante na gestão das espécies de peixes ameaçadas ou não de extinção (FAO/UNEP 1981; FAO 2007b) sendo uma condição fundamental para a manutenção da sobrevivência e conservação desse grupo (WASKO et al., 2004). Nesse sentido, as pesquisas na ictiofauna de riachos são necessárias e urgentes.

O estudo da sistemática, evolução e ecologia das espécies de pequeno porte é o grande desafio da ictiologia Neotropical do século 21 (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2005). Apesar dos esforços, pouco se conhece sobre esta ictiofauna, um bom exemplo são as sub-bacias de drenagem do Alto rio Paraná no Estado de São Paulo, onde cerca de 70% dos riachos dessa região não tinham sido explorados satisfatoriamente em termos científicos (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 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. Este cenário mudou ligeiramente com a identificação de novas espécies (seis para a bacia do Tietê, oito para a bacia do Paranapanema e quatro para a bacia do rio Grande) além de várias espécies com *status* taxonômico indeterminado, principalmente no gênero *Astyanax* (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2004; CASTRO et al., 2005).

A partir deste conjunto de trabalhos emerge a necessidade de estudos genético-moleculares enfocando aspectos filogeográficos e filogenéticos para peixes de riachos, principalmente da bacia do Alto rio Paraná. Estes estudos são importantes ferramentas para a identificação molecular de novas espécies numa área de reconhecido endemismo e subestimativa da ictiofauna.

1.2 Estudos evolutivos e de filogeografia em peixes Neotropicais

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

Na categoria I, estão incluídos os casos em que são observadas linhagens de mtDNA bastante divergentes, em geral valores superiores a 1-2%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria II, estão as linhagens de mtDNA divergentes que ocorrem na mesma área geográfica (Simpatria). Na categoria III, ocorrem linhagens de mtDNA com baixos valores de divergência de sequências, em geral menores que 1%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria IV, estão as linhagens de mtDNA com divergência de sequências muito baixas ou praticamente nulas e que estão geograficamente localizados (Simpatria, com grande área de distribuição). Na categoria V, são encontradas linhagens pouco divergentes exibindo uma separação espacial parcial, sendo intermediária entre as categorias III e IV.

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

Este cenário mudou consideravelmente nos últimos sete anos, atualmente cerca de 60 espécies de peixes de água doce da região Neotropical apresentam dados disponíveis sobre filogeografia molecular (ALVES et al., submetido1). Entre estes se destacam os seguintes trabalhos: o estudo filogeográfico em populações de *Prochilodus lineatus* nos principais rios da América do Sul, principalmente na bacia do rio Paraná (SIVASUNDAR et al., 2001); sugerindo elevado nível de variação nucleotídica entre os haplótipos amostrados na bacia do rio Paraná, sendo possível identificar haplótipos divergentes em simpatria (subpopulações) nos rios da Plata e Uruguai. Os autores ainda sugerem que as amostras de *P. lineatus* do Alto rio Paraná (rio Mogi-Guaçu) seriam fortemente relacionadas com os haplótipos encontrados a 2600 km em rios do baixo rio Paraná na Argentina. Outro importante trabalho foi realizado por Strecker e colaboradores (2004) com populações de espécies do gênero *Astyanax* na América Central e do Norte, os resultados dos autores sugerem que a divergência genética baixa observada não é compatível com a taxonomia proposta, e que as espécies encontradas nessa região, mesmo as de cavernas, como *A. mexicanus*, devam constituir uma simples unidade taxonômica, *A. fasciatus*.

Perdices e colaboradores (2002) analisando os genes mitocondriais ATP sintetase 6/8 (ATPase 6/8) e Citocromo *b* (Cit-*b*), apresentam um extenso trabalho no gênero *Rhamdia* na América Central. As inferências filogenéticas mostraram que *R. nicaraquensis* é sinônimo de *R. laticauda* e 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 *R. quelen* apenas para a região cis-Andina da América do Sul, diferindo de Silfvergrip (1996) e Bockmann e Guazzelli (2003). Para testar essa hipótese filogeográfica de *R. quelen*, Alves e colaboradores (2007; submetido1), utilizando os genes mitocondriais ATPase 6/8 e Cit-*b*, analisaram populações desta espécie ao longo das bacias da Plata, Amazônica, Orinoco e Essequibo na América do Sul, e além de confirmar a hipótese de que *R. quelen* não está presente na América Central e na porção trans-Andina da América do Sul, os autores ainda observaram 11 distintas linhagens mitocondriais na região cis-Andina da América do Sul distintas geneticamente, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies principalmente nas bacias dos rios costeiros e do Alto rio Paraná. Froupe e colaboradores (2005), analisaram o gene ATPase 6/8 para espécies de Salmonidae, e observaram que valores de distância genética acima de 2% eram suficientes para separar as espécies do gênero.

Embora o número de espécies analisadas sob o enfoque filogeográfico tenha crescido nos últimos anos (DERGAN et al., 2002; MONTOYA-BURGOS, 2003; BATISTA e ALVES-GOMES, 2006; HUBERT et al., 2007; WILLIS et al., 2007; entre outros) ainda é inexpressivo perto do grande número de peixes de água doce que se acredita existir para a região Neotropical. O pequeno número de trabalhos utilizando dados moleculares para interpretar a história filogenética dos peixes Neotropicais tem indicado que a taxonomia dos peixes de água doce dessa região, muitas vezes, distorce nossa visão de relacionamentos ao nível de espécie (PERDICES et al., 2002). Nesse sentido, as filogenias baseadas em dados moleculares têm fornecido acesso mais objetivo à história evolutiva de espécies/populações de peixes de água doce Neotropicais fortemente relacionados e contribuem para a determinação da sua distribuição geográfica.

Nos últimos anos vários estudos enfocando as análises filogenéticas em peixes realizadas com base na análise de genes mitocondriais foram desenvolvidos e também contribuíram para o esclarecimento de problemas taxonômicos e de relações evolutivas entre grupos de espécies de peixes (MONTOYA-BURGOS et al., 1998; ZARDOYA e DOADRIO, 1999; STRECKER et al., 2004; TEMPLETON, 2004; ALVES, 2005; ALVES et al., submetido2; HARDMAN, 2005), em especial utilizando o gene mitocondrial ATPase 6/8 (PERDICES e DOADRIO, 2001; PERDICES et al. 2002; PERDICES et al., 2003; FROUPE et al., 2005; ALVES et al., submetido1).

1.3. Characiformes e a família Characidae

Dentro dos peixes teleósteos, um clado denominado superordem Ostariophysi compreende cinco ordens: Gonorynchiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes, abrigando, aproximadamente, 68% de todos os peixes de água doce e 28% dos peixes restantes (NELSON, 2006).

A ordem Characiformes, distribuída em 18 famílias: Acestrorhynchidae, Alestidae, Anostomidae, Characidae, Chilodontidae, Citharinidae, Crenuchidae, Ctenolucidae, Curimatidae, Cynodontidae, Distichodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Hepsetidae, Lebiasinidae, Parodontidae e Prochilodontidae (BUCKUP, 1998), abriga a maior diversidade de peixes de água doce com mais de 1600 espécies (DAGET e GOSSE, 1984; REIS et al., 2003) distribuídas pela África, América Central e do Sul e a região sul da América do Norte.

Essa ordem abriga peixes cujas características diagnósticas incluem a presença de escamas em todo o corpo, exceto a região da cabeça, presença de nadadeira adiposa, raios moles nas nadadeiras e pré-maxilar fixo ao crânio (FINK e FINK, 1981; SHIBATTA e OHARA, 2007). Apesar de possuírem essas características comuns capazes de agrupá-los em uma única ordem, as variações nas estratégias de vida dos Characiformes estão presentes de forma muito evidente, exibindo uma divergência fenotípica adaptativa tão grande que não se iguala a nenhuma outra ordem animal (DOMINGUES, 2005).

Characidae é, sem dúvida, a maior família de Characiformes, sendo possuidora de espécies que habitam o Texas, México e América Central e do Sul. Mais de 1100 espécies (ESCHMEYER e FONG, 2009) estão incluídas nessa família, representando alto nível de diversidade taxonômica e uma grande variedade de formas do corpo e nichos ecológicos (JAVONILLO et al., 2010).

Devido a presença de um grande número de espécies e uma variedade de formas que reflitam de maneira exata as relações de parentesco entre os membros da família Characidae, Vari e Malabarba (1998) reviram conceitos supragenéricos dentro da ordem Characiformes, assim como Weitzman e Malabarba (1999) para grupos dentro de Characidae. Ambos os trabalhos apontam que alguns conceitos pré-cladísticos de classificação ainda perduram, de tal forma que alguns gêneros e subfamílias possam não ser grupos naturais (monofiléticos). O monofiletismo dessa família é ainda mais duvidoso devido a presença de espécies e gêneros *incertae sedis*, sem a designação de subfamílias (LIMA et al., 2003a,b). Uma síntese recente das relações entre grupos dentro de Characidae, embora não resolvido em algumas partes, apresentou conjuntos de relações que não haviam sido anteriormente hipotetizadas e ressaltou que certos subgrupos da família são, de fato, monofiléticos (MALABARBA e WEITZMAN, 2003). Mirande (2009) constrói sua hipótese filogenética para a família Characidae na tentativa de se estabelecer uma classificação mais precisa. Dos 92 gêneros *incertae sedis* estudados, 75 podem ser classificados, mesmo que provisoriamente, dentro de alguns clados monofiléticos sugeridos pelo autor.

Nos últimos 10 anos, mais de 240 novas espécies foram descritas para a família Characidae (ESCHMEYER e FONG, 2009). O desejo de integrar novas espécies em uma classificação mais precisa juntamente com a complexa história taxonômica dentro de Characidae, acentua a necessidade de uma inferência rigorosa nas relações filogenéticas

(JAVONILLO et al., 2010), para assim auxiliar em uma melhor definição das relações evolutivas e taxonômicas em caracídeos.

1.4. *Astyanax paranae* e as relações taxonômicas com o complexo *scabripinnis*

O gênero *Astyanax* Baird e Girard (1854) é um dos maiores em número de espécies entre os peixes Neotropicais, com cerca de 143 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2011).

Sua ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitat em rios e riachos, fazem com que esse seja um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Embora alto, o número de espécies de *Astyanax* ainda é subestimado, sendo que entre os anos de 2003 e 2007 foram descritas 16 novas espécies, principalmente pertencentes ao complexo *scabripinnis*. A sistemática do gênero é complicada e ainda não está resolvida devido à falta de evidências para corroborar seu *status* monofilético (WEITZMAN e MALABARBA, 1999; MELO e BUCKUP, 2006; BERTACO e GARUTTI, 2007). A definição atual de *Astyanax* é baseada na combinação de caracteres propostos por Eigenmann (1917), única revisão do gênero disponível, sendo que muitos desses caracteres são compartilhados com outros gêneros de Caracídeos (BERTACO e LUCENA, 2006).

Assim, como a sistemática do gênero não está resolvida, o *status* taxonômico de algumas espécies de *Astyanax* não é completamente claro, o maior exemplo é a espécie *A. scabripinnis* Eigenmann (1921), que era composta por sete subespécies. Eigenmann (1921) ao descrever *A. scabripinnis* reconheceu diferenças morfológicas populacionais e as atribuiu erroneamente como subespécies e não como espécies distintas estritamente relacionadas. Os primeiros autores a reconhecerem *A. scabripinnis* como um complexo de espécies foram Moreira-Filho e Bertollo (1991), com base em caracteres morfológicos e cariotípicos que diagnosticaram ao menos seis populações nos rios da bacia do São Francisco e Alto rio Paraná. A discussão sobre o complexo *scabripinnis* foi expandida por Bertaco e Malabarba (2001) com a descrição de duas novas espécies relacionadas ao complexo de espécies. Desde então, a atual tendência é considerar as subespécies de *A. scabripinnis* como espécies válidas (BERTACO e MALABARBA, 2001; LIMA et al., 2003; BERTACO e LUCENA, 2006).

As espécies que compõem o complexo *A. scabripinnis* estão distribuídas ao longo das bacias dos rios Paraná (Alto e Baixo Paraná), São Francisco, Paraíba do Sul, Doce, Uruguai e Jacuí, e, de acordo com Bertaco e Lucena (2006), é composto por 15 espécies: *A. microschemos* (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, ARG), *A. cremnobates* (bacia do rio Jacuí, RS), *A. brachypterygium* (bacia dos rios Jacuí e Uruguai, RS), *A. leonidas* (médio rio Paraná, ARG), *A. troya* (médio rio Paraná, ARG), *A. ita* (bacia do rio Iguaçu, ARG), *A. paris* (bacia do rio Uruguai, ARG) e *A. totae* (bacia do rio Iguaçu, PR). Embora as subespécies de *A. scabripinnis* sejam reconhecidas como espécies válidas, um profundo estudo taxonômico e sistemático neste complexo ainda é necessário, para assim se estabelecerem às relações filogenéticas entre as espécies válidas e identificar novas espécies pertencentes ao complexo *scabripinnis*. Nesse sentido as análises moleculares são fundamentais para estabelecerem essas relações.

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

1.5. A bacia do Alto rio Paraná como área de estudo

A bacia hidrográfica do Alto rio Paraná pertence à região ictiofaunística do Paraná, que inclui o sistema dos rios da Prata, Uruguai, Paraná e Paraguai, e representa o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul, com 3.2 milhões de km² (LOWE-MCCONNELL, 1999). O Alto rio Paraná corresponde à porção da bacia do rio Paraná situada a montante de Sete Quedas (agora inundada pelo reservatório de Itaipu), abrigando grandes tributários como os rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema (CASTRO et al., 2003). A drenagem do Alto rio Paraná possui aproximadamente 900.000 km², incluindo o norte do

Estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, a maioria do Estado de São Paulo (a oeste da Serra do Mar), sul de Minas Gerais, sul de Goiás e uma área pequena do Paraguai oriental, adjacente ao Mato Grosso do Sul.

O Alto Paraná é uma área complexa devido às atividades tectônicas pelas quais tem passado desde o início do Terciário (AB'SABER, 1998). Essas atividades, associadas ao complexo sistema de falhas existentes na área, são a principal causa de diversos eventos de captura de cabeceiras, como ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (CASTRO et al., 2003), e que foram responsáveis pela distribuição de algumas de suas espécies também em drenagens vizinhas, tais como: rios Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e algumas drenagens litorâneas menores (LANGEANI, 1989; WEITZMAN e MALABARBA, 1999; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2006; SERRA et al., 2007), ou ainda no Rio São Francisco (BRITSKI et al., 1988; BRITTO e CASTRO, 2002).

Levantamentos recentes em ambientes de riachos e de cabeceiras no Alto Paraná, principalmente do Estado de São Paulo (CASTRO e CASATTI 1997; CASATTI et al. 2001; CASTRO et al. 2003, 2004, 2005; LANGEANI et al. 2005a,b), indicam que essa região é portadora de uma fauna bastante diversificada, possuindo tanto espécies alóctones quanto exóticas. Cabe ressaltar, ainda, que cerca de 6 a 15% das espécies referidas são constituídas por espécies novas (CASTRO et al. 2003, 2004, 2005).

Há evidências de que para alguns grupos de peixes, como do gênero *Astyanax*, o Alto rio Paraná constitua uma área de endemismo, conectada à grande barreira para os peixes migradores representada até recentemente por Sete Quedas, que isolou por muito tempo a maioria da ictiofauna do Alto rio Paraná da fauna remanescente dos sistemas dos rios da Prata, Uruguai, Paraná e Paraguai (CASTRO et al, 2003).

Embora seja conhecido que essa bacia abriga sete espécies pertencentes ao gênero: *Astyanax altiparanae*, *A. biotae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus*, *A. paranae*, *A. shubarti*, *A. trierythropterus*, há ainda a ocorrência de três complexos de espécies: “*A. scabripinnis*” (*A. paranae*), “*A. fasciatus*” (*A. fasciatus*) e “*A. bimaculatus*” (*A. altiparanae*), segundo a revisão taxonômica feita por Tavares (2007). Esses dados mostram que como a sistemática do gênero ainda não está resolvida, o *status* taxonômico de muitas espécies de *Astyanax* não é completamente claro, evidenciando a necessidade de uma maior quantidade de estudos que visem esclarecer essa problemática.

1.6. Enfoque genético em populações de *Astyanax paranae*

Pouco se conhece sobre a estrutura populacional de *A. paranae* através de dados moleculares, Moysés e Almeida-Toledo (2002) apresentaram as relações haplotípicas entre cinco espécies de *Astyanax*, e ressaltaram que *A. paranae* possui a menor diversidade haplotípica entre elas, embora tenham analisado apenas uma população. A baixa diversidade genética é atribuída pelos autores ao isolamento populacional pelo hábito restrito as nascentes de riachos, reduzindo o fluxo gênico. Por outro lado, o baixo número de indivíduos analisados, de apenas uma população, não permite concluir que *A. paranae* tenha baixa variabilidade genética na bacia do Alto rio Paraná, ao contrário, o isolamento geográfico das populações deve atribuir a elas alta variabilidade genética interpopulacional e possivelmente baixa ou moderada variação intrapopulacional.

Zenatti (2006) realizou uma análise filogeográfica para *A. scabripinnis* da bacia dos rios Grande e Paraíba do Sul na região de Campos de Jordão/SP, evidenciando a presença de fluxo gênico interpopulacional, comprovado pela baixa diversidade nucleotídica (0.00283) e haplotípica (0.830). Esses dados, segundo a autora, sugerem que as populações das duas bacias hidrográficas estiveram em contato anteriormente ao soerguimento da Serra da Mantiqueira e hoje se encontram geograficamente separadas. No entanto, o soerguimento da serra se deu no final do Cretáceo (por volta de 80 milhões de anos (Ma)), muito tempo antes dos fósseis de Tetragonopterinae datados de 2 a 11 Ma terem sido encontrados por Travassos (1955). Portanto, seria mais plausível propor que a presença de haplótipos compartilhados seja devido a eventos de captura de cabeceiras. Os dados obtidos por Zenatti foram a partir da análise de um baixo número de indivíduos (25) além de um fragmento curto do gene mitocondrial *Cit-b* (688pb), esses fatores impediram uma análise precisa da história biogeográfica de *Astyanax scabripinnis* da região de Campos do Jordão, uma vez que as populações estudadas possam constituir espécies diferentes, já que para a bacia do rio Paraíba do Sul são encontradas três espécies de *Astyanax*: *A. jenynsi*, *A. intermedius* e *A. parahybae*, enquanto na bacia do rio Grande (Alto Paraná) é encontrada *A. paranae*.

Moreira-Filho e Bertollo (1991) sugeriram que *A. scabripinnis* deveria se tratar de um complexo de espécies com base em análises de variáveis canônicas e cariotípicas em populações do rio São Francisco e do Alto rio Paraná (hoje *A. paranae*). Estes resultados foram úteis para separar as populações dessas duas bacias, porém entre populações do Alto rio

Paraná também foram observadas diferenças, sugerindo mais de uma espécie nessa bacia. São observados três números diplóides em *A. scabripinnis* (*A. paranae*), $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998; ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002). Ferreira e colaboradores (2002) apresentam o cariótipo de *A. scabripinnis paranae* da sua localidade tipo ($2n=48$ cromossomos), ressaltando que as populações dessa espécie na bacia do Alto rio Paraná que possuem número diplóide diferente devam representar outra espécie.

Os números diplóides mais frequentes em *A. paranae* da bacia do Alto rio Paraná são $2n=50$ e $2n=48$ cromossomos, entretanto algumas populações apresentam $2n=46$ (PORTO-FORESTI et al., 1997; MAISTRO et al., 1998; ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002). Outra importante característica nessa espécie que é capaz de distinguir populações é a presença de cromossomos supranumerários de diferentes tamanhos e padrão de bandamento C (MAISTRO et al., 2000; MANTOVANI et al., 2000; ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002). Nesse sentido, os dados citogenéticos sugerem que na bacia do Alto rio Paraná a espécie *A. paranae* possa representar um complexo de espécies.

1.7. Justificativa

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

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo abordar questões acerca da história evolutiva e estrutura populacional de *A. paranae* na bacia do Alto rio Paraná através da análise da sequência de genes do DNA mitocondrial.

Para o desenvolvimento desse trabalho, foram considerados a seguinte hipótese e objetivos específicos:

Hipótese testada: “*Astyanax paranae* forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, devido à história evolutiva das populações nos principais rios dessa bacia hidrográfica”.

Objetivos específicos:

- Estabelecer as relações filogenéticas e estimar a divergência genética entre as populações de *A. paranae* e as demais espécies do gênero na bacia do Alto rio Paraná e em bacias adjacentes;
- Propor uma hipótese filogeográfica para as populações de *A. paranae*, através da elaboração de uma rede de haplótipos e realizar análises filogeográficas comparativas entre as demais espécies do gênero;
- Propor modelos biogeográficos de dispersão e colonização populacional para a *A. paranae* na bacia do Alto rio Paraná buscando através do uso do relógio molecular estimar o tempo dos principais eventos.
- Caracterizar quatro espécies de *Astyanax* da Bacia do Alto rio Paraná, através da análise de PCR-RFLP de DNA mitocondrial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Análises filogenéticas e filogeográficas

Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas coletas de exemplares de *Astyanax paranae* (Characidae) (Figura 1) em rios pertencentes à bacia do Alto rio Paraná (Figura 2), assim como exemplares de outras espécies do gênero presentes nessa bacia (*A. bockmanni*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus*), além de *A. ribeirae* e *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira de Iguape, *A. parahybae*, proveniente da bacia do rio Paraíba do Sul e *A. biotae*, proveniente da bacia do rio Paranapanema. As espécies *Serrapinnus notomelas* e *Bryconamericus* sp. foram utilizadas como grupos externos no enraizamento das árvores filogenéticas.

A amostragem completa dos 158 indivíduos analisados, bem como os 88 indivíduos identificados como *A. paranae* encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1.: Lista dos indivíduos amostrados de acordo com espécie e localização.

Nº LGP	BACIA	SUB-BACIA	POPULAÇÃO
<i>Astyanax paranae</i>			
439	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
440	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
1026	Rio Paranapanema	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap
1028	Rio Paranapanema	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap
477	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg
478	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg
479	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg
480	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg
481	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg
369	Rio Tietê	Rib. Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc
374	Rio Tietê	Rib. Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc
539	Rio Grande	Rib. Mocoquinha (Cajuru/SP)	GDmoc
541	Rio Grande	Rib. Mocoquinha (Cajuru/SP)	GDmoc
555	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms
556	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms
557	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms
558	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms
559	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms
544	Rio Paranapanema	Rio Tibagi/PR	PPtib
1027	Rio Grande	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap
438	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
441	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
901	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPvb
442	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc
445	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc
446	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc
447	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc
448	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc
504	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp
505	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp
506	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp
841	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
842	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
843	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
844	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
534	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap
535	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap
536	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap
1638	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1644	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1669	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
s/nº 0	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1002	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb
1003	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb
1004	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb
1005	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb
1006	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb
1653	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub

1675	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1676	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1677	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
517	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3
518	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3
519	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3
520	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3
521	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2
522	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2
523	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2
524	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2
993	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast
994	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast
995	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast
996	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast
997	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast
546	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolândia/PR)	PPc
547	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolândia/PR)	PPc
548	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolândia/PR)	PPc
549	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolândia/PR)	PPc
551	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb
553	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb
554	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb
1692	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
513	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1
514	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1
515	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1
516	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1
1011	Rio Paranaíba	Córrego s/nome (Rio Verde/GO)	Prv
878	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma
879	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma
880	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma
881	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma
882	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma
1687	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1690	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
1078	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai
1079	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai
1080	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai
1578	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub
<i>Astyanax scabripinnis</i>			
952	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert
953	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert
954	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert
955	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert
956	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert
<i>Astyanax bockmanni</i>			
918	Rio Tietê	Rib. Barra Seca (Bauru/SP)	TTbs
935	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
936	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
944	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
746	Rio Paranapanema	Rib. Veu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn

747	Rio Paranapanema	Rib. Vêu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
751	Rio Paranapanema	Rib. Vêu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
752	Rio Paranapanema	Rib. Vêu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
924	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb
926	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb
928	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb
957	Rio Tietê	Rib. Marapuama (Bauru/SP)	TTmarap
461	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
462	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
463	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
464	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
465	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
934	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
943	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
945	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
946	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn
927	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb
<i>Astyanax biotae</i>			
947	Rio Paranapanema	Córrego Água Mole (Diamantina do Norte/PR)	PPbio
948	Rio Paranapanema	Córrego Água Mole (Diamantina do Norte/PR)	PPbio
<i>Astyanax fasciatus</i>			
852	Rio Grande	Rio Mogi-Guaçu (Porto Ferreira/SP)	GDmg
33	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
36	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
14	Rio Tietê	Rib Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc
91	Rio Tietê	Rib Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc
475	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
476	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap
<i>Astyanax altiparanae</i>			
458	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)	TTci
459	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)	TTci
31	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTTrc
838	Rio Paranapanema	Rib.Vêu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
840	Rio Paranapanema	Rib.Vêu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn
<i>Astyanax ribeirae</i>			
788	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
789	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
790	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
791	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
792	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
805	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
806	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
808	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
809	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac
<i>Astyanax janeiroensis</i>			
1014	Rio Ribeira	Rio Turvo (Cerro Azul/PR)	Rjan
1017	Rio Ribeira	Rio Turvo (Cerro Azul/PR)	Rjan
<i>Astyanax sp D</i>			
1036	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD
1039	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD
1040	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD
1042	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD

1043	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD
1044	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD
<i>Astyanax parahybae</i>			
874	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg
875	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg
876	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg
877	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg
<i>Serrapinnus notomelas</i>			
905	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb
906	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb
908	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb
909	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb
<i>Bryconamericus sp</i>			
998	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam
999	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam
1000	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam
1001	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam



Figura 1.: Exemplar de *Astyanax paranae*

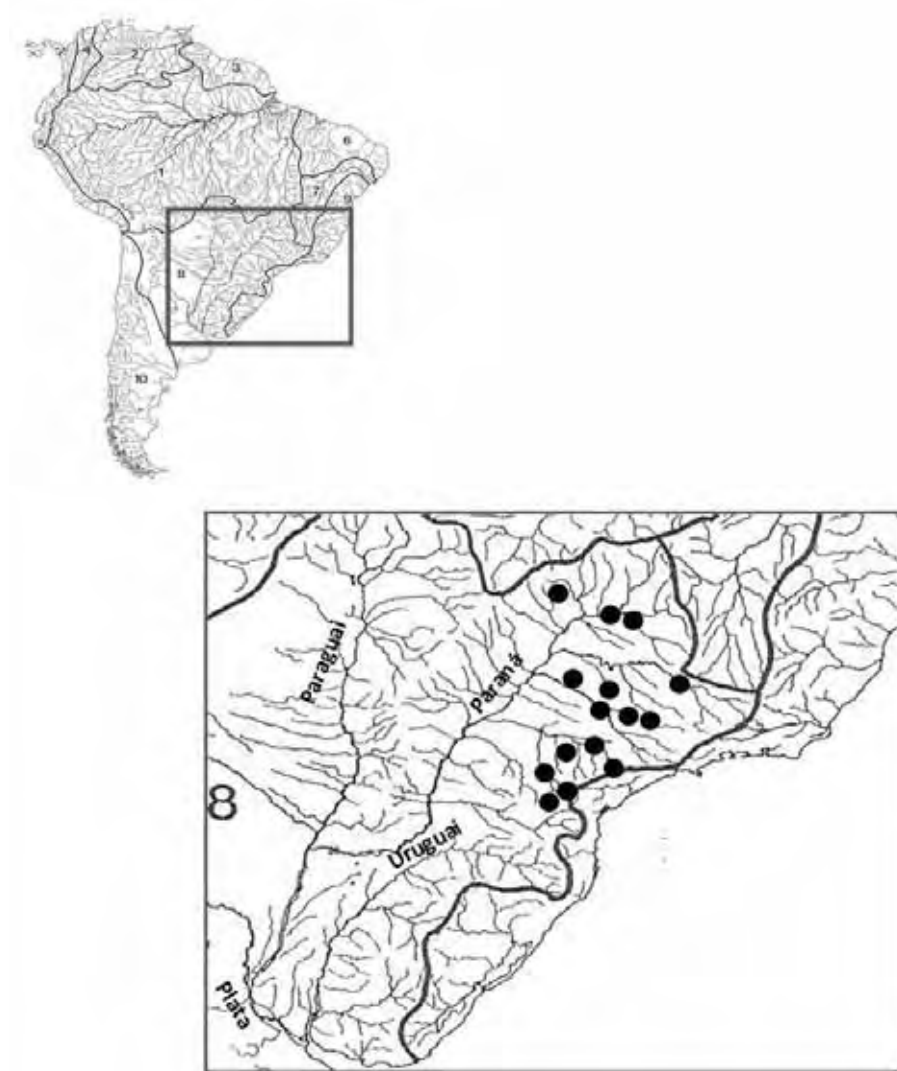


Figura 2.: Mapa da localização das populações de *Astyanax paranae* analisadas.

3.1.2. Análises de fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

Foram coletados 20 indivíduos de quatro espécies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*) em quatro localidades na bacia do Alto rio Paraná (Tabela 2). Os espécimes foram morfológicamente identificados e depositados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP, Rio Claro/SP, com os seguintes números de acesso: *A. altiparanae* LGP838-840, 452-453; *A. bockmanni* LGP746-750; *A. cf. fasciatus* LGP851-854, 856; *A. paranae* LGP484, 485, 489, 495, 499.

Tabela 2.: Lista das 4 espécies de *Astyanax* analisadas por PCR-RFLP na bacia do Alto rio Paraná

Espécies	Rio	Bacia	Localidade	Coordenadas	
<i>A. altiparanae</i>	Itapetininga	Paranapanema	Itapetininga/SP	23°53'50.12"S	48°15'33.40"W
<i>A. bockmanni</i>	Pardo	Paranapanema	Botucatu/SP	22°56'49.02"S	48°35'13.85"W
<i>A. cf. fasciatus</i>	Mogi-Guaçu	Mogi-Guaçu	Porto Ferreira/SP	21°50'08.01'S	47°30'05.11"W
<i>A. paranae</i>	Canta Galo	Tietê	Rio Claro/SP	22°25'21.67"S	47°47'56.74"W

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Análises filogenéticas e filogeográficas

3.2.1.1. Extração de DNA

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

1. Preparar uma solução de lise contendo:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
TNE 1X	300µL
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	30µL
SDS 10%	20µL
Proteinase K (20mg/mL)	25µL
Volume final	375µL

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

3. Deixar os tubos em estufa a 37°C *overnight* e, em seguida, adicionar 8µL de RNase 10mg/mL;
4. Deixar os tubos com RNase em estufa a 37°C por 1 hora, agitando o tubo a cada 30 minutos;
5. Levar os tubos com os tecidos completamente digeridos para a capela e adicionar 400µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1);
6. Dar um vórtex de 30 segundos e, em seguida, centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos;
7. Retirar os tubos da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e transferir o sobrenadante (fase aquosa contendo DNA) para um novo tubo correspondente;
8. Adicionar a cada tubo 60µL acetato de sódio 3M (pH 5.3) e inverter o tubo lentamente para a completa mistura do sal com a solução;
9. Adicionar a cada tubo 600µL de etanol absoluto gelado e inverter o tubo como no passo anterior (se houver formação de nuvens, transferir para um novo tubo contendo 1000µL de etanol absoluto);
10. Deixar os tubos no freezer por 30 minutos;
11. Centrifugar os tubos a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa retirada da mistura etanol + acetato de sódio;
12. Adicionar 150µL de etanol 70% a temperatura ambiente e centrifugar novamente a 14.000 rpm por 30 minutos;
13. Descartar o sobrenadante, certificando-se que o precipitado de DNA continua aderido à parede do tubo;
14. Repetir os passos 12 e 13 (exceto nos tubos onde ocorreu a formação de nuvens);
15. Secar o DNA em estufa a 37°C por 30 minutos, colocando os tubos abertos sobre folhas de papel absorventes;
16. Ressuspender o DNA com 100µL (sem nuvens) ou com 250µL (com nuvens) de água Ultrapura autoclavada, agitando o tubo delicadamente para soltar o DNA que está aderido à parede;
17. Levar o material para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferir os tubos para a geladeira (4°C) e manter *overnight* para a completa ressuspensão;
18. Armazenar em freezer (-20°C) para conservar por longo prazo.

3.2.1.2. Amplificação do DNA

O gene mitocondrial ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8) incluindo as sequências conservadas de tRNA (RNA transportadores) que flanqueiam este complexo de genes, foram amplificadas no ciclador térmico (EPPENDORF™) utilizando os *primers* L8331 (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3') (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>), obtendo um total de 842 pares de bases.

A reação de amplificação por PCR dos genes ATPase 6/8 foi preparada em um tubo de 0.5 mL, com as quantidades descritas a seguir:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
Mix PCR * (Qiagen)	6.25µL
Água Ultrapura	5.25µL
Primer F 10µM	0.5µL
Primer R 10µM	0.5µL
DNA	1.0µL
Volume final	13.5µL

* Na solução de MIX PCR estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, Tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1.5mM e dDNTTP (dideoxinucleotídeo trifosfato) 200µM.

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

A reação de PCR foi realizada em um termociclador EPPENDORF®, modelo MasterCycler EP Gradient. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1.0%, corados com 2µL SYBER Safe (10.000X) (Invitrogen®), em 1µL tampão de corrida *blue juice* (10X) e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. A quantificação do produto gênico amplificado foi realizada utilizando o marcador de peso molecular Lambda (λ) DNA 50ng e 30ng, verificados em gel de agarose 1.0%.

3.2.1.3. Limpeza do produto de PCR para sequenciamento

Para a realização do PCR de sequenciamento do gene ATPase 6/8, padronizou-se as amostras em 50ng de DNA/ μ L, nesse sentido, apenas as amostras amplificadas por PCR que obtiveram este valor na quantificação seguiram para a próxima etapa de purificação através do tratamento com a enzima EXOSAP (GE Healthcare), de acordo com o protocolo abaixo:

1. Limpar 10 μ L do produto de PCR, adicionando 2 μ L de Exosap e 2 μ L de água Ultrapura autoclavada;
2. Levar os tubos recém preparados ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37°C e 15 minutos a 80°C;
3. Retirar os tubos do termociclador e preparar um tubo contendo a quantidade correspondente ao número de amostras com o *primer forward* (F) e outro com o *primer reverse* (R) a 10mM.

**para cada amostra limpa (14 μ L) foram aliquotados 4 μ L de cada primer.*

O DNA purificado foi enviado para o sequenciamento na Coreia, onde foi realizada a reação de PCR de sequenciamento, a limpeza deste PCR e o sequenciamento num sequenciador automático de DNA através de terceirização de serviços com a empresa MACROGEN Inc.

3.2.1.4. Análise das sequências

As sequências de DNA obtidas foram submetidas inicialmente ao Blast (NCBI) para verificar o nível de similaridade com as demais sequências já depositadas nesse banco de dados. A partir de então, conduziu-se o alinhamento através do programa BioEdit (HALL, 1999), sendo o alinhamento testado manualmente e as posições das bases foram corrigidas quando necessário. Os *gaps* foram tratados como dados ausentes e, devido ao gene ATPase 6/8 ser codificante, não houve a presença de *gaps* no alinhamento final após correção manual.

Além disso, utilizou-se o programa DAMBE, *Data analysis in molecular biology and evolution* (XIA e XIE, 2001) como uma ferramenta complementar para a elaboração das sequências consenso e na verificação da ocorrência de saturação dos nucleotídeos. No programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) foram realizadas as análises de composição nucleotídica, examinada por variações de bases para todas as posições, e o teste de homogeneidade de frequência de bases " χ^2 ".

Para as análises filogenéticas a escolha do modelo de distância genética que melhor representava o gene analisado foi realizada com o programa Modeltest 3.06 (POSADA e CRANDALL, 1998).

As análises filogenéticas foram conduzidas no programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) empregando-se os métodos de distância genética e de máxima parcimônia. A análise filogenética e de distância genética foram realizadas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando os parâmetros obtidos pelo Modeltest. Para a análise de Máxima Parcimônia (MP) foram utilizadas as buscas heurísticas de topologias com 10 réplicas de adição de taxa ao acaso. Apenas as topologias mínimas foram retidas e os ramos com comprimentos zero foram colapsados. Análises filogenéticas adicionais pelo método probabilístico da Inferência *Bayesiana* (IB) foram conduzidas através do emprego do programa MrBayes v. 3.1.2 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001). Foram utilizados 2 milhões de gerações de quatro cadeias MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) sob o modelo de evolução escolhido no ModelTest, com frequência de amostragem de topologias a cada 100 gerações. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas para NJ e MP) (FELSENSTEIN, 1985) e as probabilidades posteriores (para IB) foram usados como valores de suporte para os agrupamentos gerados nas análises filogenéticas.

Para determinar se a taxa de substituição de nucleotídeo para o gene ATPase 6/8 é constante em *A. paranae* foi usado o teste de χ^2 para se obter a taxa de *Maximum Likelihood* (*log-likelihood*) para topologias *clock-enforced* e *non-enforced* (PAGE e HOLMES, 1998) realizadas no PAUP*. Sendo confirmada a hipótese de taxa constante de substituição de nucleotídeos, foi utilizado a distância genética não corrigida “p” para se obter os valores de distância entre as sequências possibilitando o cálculo do tempo de divergência entre estas. A calibração do relógio molecular para o gene de DNA mitocondrial ATPase 6/8 em peixes foi de 1.3% de divergência nucleotídica por milhão de ano (Ma) (BERMINGHAM et al., 1997; PERDICES et al., 2002).

Para as análises filogeográficas foi utilizado o programa TCS, o qual gera rede de haplótipos usando parcimônia estatística com 95% de significância, sendo a rede desconectada acima de 13 eventos mutacionais (TEMPLETON et al., 1987).

3.2.2. Análises de fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

3.2.2.1. Digestão enzimática

Para as análises de fragmentos de restrição foram utilizados os genes mitocondriais completos ATPase 6/8 (*primers* citados anteriormente, 850pb) e Citocromo *b* (Cit-*b*) (1100pb) utilizando os seguintes *primers*: L-GluDG-CitF (5' – TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG – 3') e H-16460-CitR (5' – CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G – 3'), as reações de PCR e o programa de amplificação para os dois genes foram os mesmos já descritos no item 3.2.1.2. Após a amplificação completa dos genes mitocondriais ATPase 6/8 e Cit-*b* para as espécies pertencentes ao gênero *Astyanax*, as amostras foram submetidas à digestão com as endonucleases *AluI*, *BamHI*, *HindIII*, *HpaII* e *XbaI*, de acordo com as seguintes quantidades:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
Produto de PCR	5µL
Água Ultrapura	9µL
Tampão	1µL
Enzima	1µL
Volume final	16µL

Essa mistura foi incubada a 37°C *overnight*, no termociclador. Decorrido este período, as enzimas foram inativadas através da incubação a 65°C por 20 minutos para as enzimas *AluI*, *HpaII* e *XbaI* e incubação a 80°C por 20 minutos para as enzimas *BamHI* e *HindIII*.

Os fragmentos de restrição gerados foram visualizados em gel de agarose 2.0% corados com SYBER Safe.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1 – EVIDÊNCIAS MOLECULARES DOS PADRÕES EVOLUTIVOS E FILOGEOGRÁFICOS DE POPULAÇÕES DE *Astyanax paranae* (PISCES: CHARACIDAE) COM BASE EM CARACTERES DO DNA MITOCONDRIAL.

Maria Eduarda Marreta, Anabel Perdices, Cláudio Oliveira, Patrícia P. Parise-Maltempi, Anderson Luís Alves.

ARTIGO 2 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE QUATRO ESPÉCIES DE *Astyanax* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) COM BASE EM PCR-RFLP.

Maria Eduarda Marreta, Allan P. B. Pozzobon, Anabel Perdices, Patrícia P. Parise-Maltempi, Anderson Luís Alves.

ARTIGO 1 – Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial.

Maria Eduarda Marreta¹, Anabel Perdices², Cláudio Oliveira³, Patrícia P. Parise-Maltempi¹,
Anderson Luís Alves¹.

¹ *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Laboratório de Genética de Peixes, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av. 24A 1515, Rio Claro, 13506-900, SP, Brasil.*

² *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006, Madrid, Espanha.*

³ *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Morfologia, Distrito de Rubião Júnior s/nº, Botucatu, 18618-970, SP, Brasil.*

RESUMO

Astyanax paranae é uma espécie de peixe de pequeno porte que habita cabeceiras de riachos, resultando no isolamento geográfico entre as populações. Sendo considerada endêmica da bacia do Alto rio Paraná, recentemente foi elevada a espécie, deixando de ser considerada uma subespécie de *A. scabripinnis*, sendo a única espécie do “complexo *scabripinnis*” presente nessa bacia. Os raros relatos de dados moleculares populacionais e a ausência de uma análise filogeográfica consistente para populações de *A. paranae*, aliado as evidências citogenéticas e morfológicas de que essa espécie não represente uma unidade monofilética, reforçam a necessidade de um amplo estudo evolutivo e biogeográfico na bacia do Alto rio Paraná, reconhecidamente uma área de endemismo ictiológico. Nesse sentido, caracterizou-se a variabilidade genética em populações de *A. paranae* a fim de se estabelecer as relações filogenéticas e filogeográficas entre as linhagens de DNA na bacia do Alto rio Paraná, através da identificação dos haplótipos do mtDNA a partir da sequência completa do gene da ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8), num total de 842pb. As análises foram conduzidas em 88 exemplares de *A. paranae* além de 70 exemplares de espécies relacionadas do gênero, num total de 158 indivíduos analisados. Como grupo externo foram incluídos exemplares de *Serrapinnus* e *Bryconamericus*. As topologias foram geradas a partir dos métodos de *Neighbor Joining*, Máxima Parcimônia, no programa PAUP 4.0b10 e Inferência Bayesiana, no programa Mr. Bayes, enquanto a rede de haplótipo foi gerada no programa TCS. O relógio molecular foi utilizado para estimar o tempo de divergência entre as espécies/linhagens adotando a taxa de 1.3%/Ma para o gene ATPase 6/8. Tanto as análises filogenéticas como as filogeográficas suportam a hipótese de que *A. paranae* não forma uma unidade monofilética no Alto rio Paraná, sendo possível identificar sete distintas linhagens, das quais cinco possivelmente representam novas espécies. As relações filogenéticas e de filogeografia comparativa entre as linhagens de *A. paranae* e as demais espécies analisadas do gênero sustentam a proposta da hipótese de colonização de *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná a partir da bacia do Atlântico Leste.

Palavras-chave: *Astyanax*. Filogenia. Filogeografia. Alto rio Paraná. ATPase 6/8.

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical é conhecida por abrigar uma grande diversidade de peixes de água doce, sendo que de acordo com Reis e colaboradores (2003), abriga 71 famílias e 4.475 espécies descritas.

Apesar da grande diversidade existente nessa região, ainda é pequeno o número de trabalhos que utilizam dados moleculares para interpretar a história filogenética dos peixes, o que tem indicado que sua taxonomia, muitas vezes, distorce nossa visão de relacionamentos ao nível de espécie (PERDICES et al., 2002). Nesse sentido, as filogenias baseadas em dados moleculares têm fornecido acesso mais objetivo à história evolutiva de espécies/populações de peixes de água doce Neotropicais fortemente relacionados, auxiliando no correto levantamento ictiofaunístico.

O gênero *Astyanax* Baird e Girard (1854) é um dos maiores em número de espécies entre os peixes Neotropicais, com cerca de 143 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2011). Sua ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitat em rios e riachos, fazem com que esse seja um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Embora alto, o número de espécies de *Astyanax* ainda é subestimado, devido a sua sistemática complicada e ainda não resolvida, resultado da falta de evidências para corroborar seu *status* monofilético (WEITZMAN e MALABARBA, 1998; MELO e BUCKUP, 2006; BERTACO e GARUTTI, 2007, MIRANDE, 2009).

Assim como a sistemática do gênero não está resolvida, o *status* taxonômico de algumas espécies de *Astyanax* não é completamente claro e, muitas vezes, complexos de espécies são encontrados, sobretudo no Alto rio Paraná, área de reconhecido endemismo ictiológico, onde estão presentes representantes de três complexos de espécies: “*A. scabripinnis*” (*A. paranae*), “*A. fasciatus*” (*A. fasciatus*) e “*A. bimaculatus*” (*A. altiparanae*), de acordo com a revisão taxonômica do gênero feita por Tavares (2007).

Dados citogenéticos sugerem que nessa bacia a espécie *A. paranae* possa representar um complexo de espécies, uma vez que são encontrados os seguintes números diplóides $2n=50$, $2n=48$ e, em algumas populações, $2n=46$ cromossomos (MAISTRO et. al., 1998; ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002; PORTO-FORESTI et al., 1997), além da presença de

cromossomos supranumerários de diferentes tamanhos e padrão de bandamento C (ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002; MAISTRO et al., 2000; MANTOVANI et al., 2000).

Esses fatos sugerem a necessidade de um amplo estudo filogenético em *A. paranae* e o torna um excelente modelo para estudos de estrutura de populações e história evolutiva em peixes de riachos Neotropicais. Assim, o presente estudo teve como objetivo abordar questões acerca da história evolutiva e estrutura populacional de *A. paranae* na bacia do Alto rio Paraná através da análise da sequência de genes do DNA mitocondrial, para poder determinar se essa espécie forma de fato uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas coletas de exemplares de *Astyanax paranae* (Characidae) em rios pertencentes à bacia do Alto rio Paraná, assim como exemplares de outras espécies do gênero presentes nessa bacia (*A. bockmanni*, *A. altiparanae*, e *A. fasciatus*), além de *A. ribeirae* e *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira de Iguape, *A. parahybae*, proveniente da bacia do rio Paraíba do Sul e *A. biotae*, proveniente da bacia do rio Paranapanema (Figura 1). As espécies *Serrapinnus notomelas* e *Bryconamericus* sp foram utilizadas como grupos externos no enraizamento das árvores filogenéticas.

A amostragem completa dos 158 indivíduos analisados, bem como os 88 indivíduos que haviam sido identificados como *A. paranae* encontram-se apresentados na Tabela 1**.

2.2 MÉTODOS

2.2.1. Extração e amplificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído de amostras de músculo e/ou fígado pela técnica do Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (SAMBROOK, 2001). O gene mitocondrial ATPase 6/8 (842 pb) foi amplificado via PCR em 13µL de reação: 6.25 µL mix PCR (Qiagen), 5.25 µL água Ultrapura, 0.5 µL de cada *primer* 10 mM (R e F) e 1µL de DNA. Os *primers* usados para o gene ATPase 6/8 foram: L8331 (5'- AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3') (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>). O programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45

segundos, 55°C por 45 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 90 segundos, estendendo a cadeia e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A amplificação do gene mitocondrial foi verificada em gel de agarose 1.0% corado com 2µL SYBER Safe (10.000X) (Invitrogen), em 1µL tampão de corrida *blue juice* (10X).

2.2.2. Limpeza do produto de PCR para sequenciamento

Depois da amplificação, somente as amostras com 50ng de DNA/µL foram purificadas com a enzima EXOSAP (GE Healthcare), seguindo as seguintes instruções: 10 µL de produto de PCR, 2 µL de EXOSAP, 2 µL de água Ultrapura. A reação foi levada para o termociclador por 1 hora a 37°C e 15 minutos a 80°C. O DNA purificado foi enviado para o sequenciamento na Coreia, onde foi realizada a reação de PCR de sequenciamento, a limpeza deste PCR e o sequenciamento num sequenciador automático de DNA através de terceirização de serviços com a empresa MACROGEN Inc.

2.2.3. Análise das sequências

O alinhamento das sequências de DNA foi feito usando o programa BioEdit (HALL, 1999), Os *gaps* foram tratados como dados ausentes e, devido ao gene ATPase 6/8 ser codificante, não houve a presença de *gaps* no alinhamento final após correção manual. O programa DAMBE, *Data analysis in molecular biology and evolution* (XIA e XIE, 2001) foi utilizado como uma ferramenta complementar para a elaboração das sequências consenso e na verificação da ocorrência de saturação dos nucleotídeos. No programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) foram realizadas as análises de composição nucleotídica, examinada por variações de bases para todas as posições, e o teste de homogeneidade de frequência de bases “ χ^2 ”.

Para as análises filogenéticas a escolha do modelo de distância genética que melhor representava o gene analisado foi realizada com o programa Modeltest 3.06 (POSADA e CRANDALL, 1998). Os métodos de distância genética e de máxima parcimônia foram conduzidos no programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) para realização das análises filogenéticas. A análise filogenética e de distância genética foram realizadas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando os parâmetros obtidos pelo Modeltest. Para a análise de Máxima Parcimônia (MP) foram utilizadas as buscas heurísticas de topologias com 10 réplicas de adição de taxa ao acaso. Apenas as topologias mínimas foram retidas e os ramos

com comprimentos zero foram colapsados. Análises filogenéticas adicionais pelo método probabilístico da Inferência *Bayesiana* (IB) foram conduzidas através do emprego do programa MrBayes v. 3.1.2 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001). Foram utilizados 2 milhões de gerações de quatro cadeias MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) sob o modelo de evolução escolhido no ModelTest, com frequência de amostragem de topologias a cada 100 gerações. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas para NJ e MP) (FELSENSTEIN, 1985) e as probabilidades posteriores (para IB) foram usados como valores de suporte para os agrupamentos gerados nas análises filogenéticas.

Para determinar se a taxa de substituição de nucleotídeo para o gene ATPase 6/8 é constante em *A. paranae* foi usado o teste de χ^2 para se obter a taxa de *Maximum Likelihood* (*log-likelihood*) para topologias *clock-enforced* e *non-enforced* (PAGE e HOLMES, 1998) realizadas no PAUP*. A calibração do relógio molecular para o gene mitocondrial ATPase 6/8 em peixes foi de 1.3% de divergência nucleotídica por milhão de ano (Ma) (BERMINGHAM et al., 1997; PERDICES et al., 2002).

Para as análises filogeográficas foi utilizado o programa TCS, o qual gera rede de haplótipos usando parcimônia estatística com 95% de significância, sendo a rede desconectada acima de 13 eventos mutacionais (TEMPLETON et al., 1987).

3. RESULTADOS

3.1. Análises de sequências do gene ATPase 6/8

Todos os indivíduos analisados possuíam sequências com tamanho de 842 pares de bases (pb) para o gene ATPase 6/8, das quais 532pb eram conservadas, 310pb variáveis, 298 informativas para parcimônia e 12pb *singletons*. Os nucleotídeos presentes nas sequências dos indivíduos pertencentes ao gênero *Astyanax* apresentaram a seguinte composição média de bases: **T**: 29.9%, **C**: 27.7%, **A**: 28.9% e **G**: 13.5% (Tabela 1, Anexo 1). A não ocorrência de saturação dos dados pôde ser observada plotando-se as transições (S) e transversões (V) contra a divergência genética estimada pelo modelo de evolução de sequências “Felsenstein 84” (Figura 1, Anexo 1).

Segundo o programa Modeltest 3.06 (POSADA e CRANDALL, 1998), o modelo selecionado pelo critério de Akaike para o gene ATPase 6/8 foi TIM+I+G (frequência de

bases: A= 0.294, C= 0.275, G= 0.121, T= 0.310; taxas de substituição: A-C= 1.0000, A-G= 22.6141, A-T= 1.9716, C-G= 1.9716, C-T= 14.7042, G-T= 1.0).

3.2. Análises filogenéticas

Analisando-se as topologias obtidas pelos métodos de NJ, MP e IB foi possível constatar que as espécies de *Astyanax* estudadas se dividiam em quatro grandes grupos: **Grupo I:** clado *A. ribeirae* e clado *A. parahybae*; **Grupo II:** clado *A. altiparanae*; **Grupo III:** clado *A. janeiroensis* e clado *Astyanax* sp. D e **Grupo IV** que está subdividido em **Grupo IVa:** clado *A. paranae* A, clado *A. paranae* B, clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C, clado *A. bockmanni*, clado *A. paranae* D e clado *A. paranae* E e em **Grupo IVb:** clado *A. paranae* F, clado *A. paranae* G + *A. biotae* + *A. fasciatus*. As topologias resultantes foram congruentes entre os três métodos analisados, o que nos permitiu elaborar uma topologia de consenso (Figura 2), excluindo-se os valores de *bootstraps* menores do que 50%. Os valores representados nos ramos correspondem, respectivamente, aos valores de *bootstrap* encontrados para NJ e MP e as probabilidades posteriores para IB.

As distâncias genéticas bem como os tempos de divergências abaixo citados se encontram representados na Tabela 2 e Figura 2.

O clado *A. paranae* A é formado por 11 populações (30 indivíduos) distribuídos entre as bacias dos rios Tietê, Paranapanema e Grande, sendo irmão do clado *A. paranae* B no qual o único representante é o indivíduo pertencente à bacia do rio Paranapanema. Esses dois clados apresentam distância genética igual a 2.03% e seu tempo de divergência ocorreu a 1.56 Ma. Esses dois clados são irmãos do clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C e o clado *A. bokmanni*. O clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C possuem baixa distância genética (0.36%), sendo bastante relacionado filogeneticamente ao clado *A. bockmanni* (seis populações; 24 indivíduos das bacias dos rios Tietê e Paranapanema), possuindo distância genética de 1.08% e tempo de divergência igual a 0.83 Ma entre eles. Observando a árvore é possível constatar que o clado *A. paranae* D (população de Uberlândia/MG) é irmão de todas as espécies acima, indicando que sua origem evolutiva é mais antiga do que as das demais e que o clado *A. paranae* E (quatro populações de Minas Gerais) é irmão do grande Grupo IVa.

O clado *A. paranae* F, que agrupa duas populações da bacia do rio Paranapanema, é irmão do clado *A. paranae* G + *A. biotae* + *A. fasciatus*, sendo distante geneticamente de 0.9% (*paranae* G + *biotae*) e de 0.77% (*fasciatus*).

O clado *A. paranae* G + *A. biotae* + *A. fasciatus* é basal para o Grupo IV, agrupando as espécies pertencentes ao Alto rio Paraná, com exceção de *A. altiparanae*, que colonizaram essa bacia a aproximadamente 1.8 Ma.

O Grupo III agrupa os clados irmãos *A. janeiroensis* (Rio Ribeira) e *Astyanax* sp. D (Rio Iguaçu/Baixo rio Paraná), que possuem 0.57% de distância genética e uma divergência de 4.0 Ma, sendo basais para o Grupo IV.

O Grupo II formado pelo clado *A. altiparanae* representa a primeira linhagem divergente da bacia do Alto rio Paraná que ocorreu a aproximadamente 14.15 Ma, indicando que a origem de *Astyanax* não ocorreu de uma só vez, havendo, pelo menos, duas origens distintas; uma para *A. altiparanae* e outra para as demais espécies.

O Grupo I formado pelos clados *A. ribeirae* (Rio Ribeira de Iguape) e *A. parahybae* (Rio Paraíba do Sul) corresponde à primeira linhagem divergente dentro das espécies de *Astyanax* analisadas, o que ocorreu a aproximadamente 17.77 Ma.

A análise de todas as espécies de *Astyanax* pôde evidenciar que a maior e a menor distância genética se dá entre o clado *A. altiparanae* e clado *A. ribeirae* (25.33%) e entre o clado *A. paranae* G + *A. biotae* e *A. fasciatus* (0.52%).

3.3. Análises filogeográficas

3.3.1. Grupo IVa

Astyanax paranae A apresentou 12 haplótipos diferentes (Tabela 3) para os 30 indivíduos de 11 populações. O haplótipo C (sp1 C) é o mais frequente (36,67%) e também o ancestral (Figura 3). Apesar desse haplótipo ser encontrado tanto na bacia do rio Tietê quanto na do rio Paranapanema, ele é mais frequente nesse último rio. Estão presentes também cinco haplótipos únicos (sp1 B, E, F, G, H) nas bacias do rio Tietê, Paranapanema e Grande.

Através da visualização da rede foi possível constatar uma quebra, formando o haplótipo A (sp2 A) no qual apenas o indivíduo 544 PPtib fazia parte (Figura 3). Esse indivíduo é o mesmo que se encontra separado dos demais *A. paranae* A quando observamos a árvore consenso (Figura 2). A sua posição na árvore bem como o não compartilhamento de haplótipos com os demais representantes da espécie nos levou a denominá-lo de *A. paranae* B.

Astyanax bockmanni apresentou nove haplótipos diferentes para os 24 indivíduos das seis populações estudadas. O haplótipo H (Ab H) é o mais frequente (29,17%) e os haplótipos

Ab C, D, G, I, únicos (Tabela 3, Figura 3). O haplótipo A, considerado ancestral para as populações analisadas, foi observado apenas na população de Paranapiacaba, cabeceira do rio Tietê. Nessa bacia ainda são encontrados os haplótipos B, C, D, F, G e H, enquanto na bacia do rio Paranapanema foram encontrados os haplótipos E, H e I, mostrando que na sub-bacia do rio Tietê ocorre maior variabilidade genética. O haplótipo H é o único compartilhado entre as duas bacias.

Astyanax scabripinnis + *A. paranae* C apresentaram cinco haplótipos, dos quais o haplótipo A (sp3 A) foi o mais frequente (44,44%) e os haplótipos sp3 B, C, E, únicos (Tabela 3, Figura 3). Os haplótipos sp3 A e B pertencem a *A. scabripinnis*, enquanto que os sp3 C, D e E, pertencem a *A. paranae* C. O haplótipo B foi considerado ancestral quando se analisa apenas o clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C. Quando a análise é feita de forma combinada com os *A. bockmanni*, é possível observar um compartilhamento do mesmo ancestral (Ab A).

Astyanax paranae D apresentou um único haplótipo (sp4 A), devido a análise de apenas uma população (quatro indivíduos), enquanto que *A. paranae* E (17 indivíduos, quatro populações) apresentou cinco haplótipos dos quais o haplótipo A (sp5 A) foi o mais frequente (29,41%) e o sp5 D, único. O haplótipo dado como ancestral foi o sp5 B, que agrupa os indivíduos do rio Itajubá (MG), bacia do rio Grande (Tabela 3, Figura 3).

3.3.2. Grupo IVb

Astyanax paranae F (localidade tipo) apresentou oito haplótipos diferentes para os nove indivíduos das duas populações estudadas. O haplótipo A (Ap A) tido como ancestral é também o mais frequente (22,22%), sendo os demais haplótipos, únicos (Tabela 3, Figura 3).

Astyanax biotae (dois indivíduos) apresentou somente um haplótipo que se encontra conectado aos três haplótipos de *A. paranae* G (quatro indivíduos, duas populações). É possível observar que o haplótipo ancestral para *A. paranae* G (sp6 A) o é também para *A. biotae*, apresentando apenas uma base diferente (Tabela 3, Figura 3).

Analisando o grupo *A. fasciatus*, foi possível observar a ocorrência de 14 haplótipos para os 23 indivíduos das 10 populações estudadas. O haplótipo A (Af A) foi o mais frequente (21,74%) e o Af B foi dado como haplótipo ancestral, estando localizado na bacia do rio Tietê. Dos 14 haplótipos encontrados, 10 foram únicos (Tabela 3, Figura 3).

Foi possível observar que tanto os indivíduos pertencentes à espécie *A. paranae* F, bem como aqueles pertencentes a *A. biotae* + *A. paranae* G apesar de não compartilharem

haplótipos com o grupo *A. fasciatus*, possuem suas redes de haplótipos interligadas, carregando apenas dois eventos mutacionais para *A. biotae* + *A. paranae* G e três, para *A. paranae* F com o haplótipo ancestral de *A. fasciatus* (Tabela 3, Figura 3).

3.3.3. Grupo III

Astyanax janeiroensis apresentou apenas um haplótipo para os dois indivíduos analisados, evidenciando que em análises futuras deve-se adicionar um maior número de indivíduos a fim de se levantar dados mais precisos sobre sua filogeografia (Tabela 3, Figura 4).

Astyanax sp. D apresentou três haplótipos para os seis indivíduos analisados. O haplótipo sp D A foi o mais frequente (66,67%), enquanto que os demais foram únicos, sendo o haplótipo spD B, o ancestral (Tabela 3, Figura 4).

Apesar da rede se encontrar conectada e de *A. janeiroensis* apresentar apenas quatro bases diferentes em relação ao haplótipo ancestral de *Astyanax* sp. D, não foi observado compartilhamento de haplótipos (Figura 4).

3.3.4. Grupo II

Astyanax altiparanae apresentou cinco haplótipos para os seis indivíduos das quatro populações analisadas. O haplótipo Aa A foi o mais frequente (33,33%) e também o ancestral, estando localizado na bacia do rio Paranapanema. Os demais haplótipos foram únicos (Tabela 3, Figura 4).

3.3.5. Grupo I

Astyanax ribeirae apresentou três haplótipos para os nove indivíduos analisados. O haplótipo Ar B além de ser o mais frequente (55,56%) também foi o ancestral (Tabela 3, Figura 4).

Astyanax parahybae apresentou apenas dois haplótipos para os quatro indivíduos analisados, sendo o haplótipo Aph A único e o Aph B o ancestral e mais frequente (75,00%) (Tabela 3, Figura 4).

4. DISCUSSÃO

4.1. Análises filogenéticas e história evolutiva de *A. paranae* e espécies relacionadas

O gênero *Astyanax* é sabidamente possuidor de uma grande complexidade, dificultando assim a inferência de relações filogenéticas. Um exemplo dessa complexidade de relações pôde ser observado no presente trabalho, no qual foi possível notar através das topologias que as espécies de *Astyanax* analisadas se dividiam em quatro grupos: **Grupo I:** clado *A. ribeirae* e clado *A. parahybae*; **Grupo II:** clado *A. altiparanae*; **Grupo III:** clado *A. janeiroensis* e clado *Astyanax* sp. D e **Grupo IV** que está subdividido em **Grupo IVa:** clado *A. paranae* A, clado *A. paranae* B, clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C, clado *A. bockmanni*, clado *A. paranae* D e clado *A. paranae* E e em **Grupo IVb:** clado *A. paranae* F, clado *A. paranae* G + *A. biotae* + *A. fasciatus*.

Os táxons de maior interesse nesse trabalho são representados pelo grupo IV que abriga as espécies da bacia do Alto rio Paraná, com exceção de *A. altiparanae* que está presente no Grupo II. Estes dados mostram que as espécies do gênero *Astyanax* que ocorrem na bacia do Alto rio Paraná não formam um clado monofilético, onde a colonização dessa bacia pelas espécies do gênero deve ter acontecido em 2 estágios: 1- incursão de uma linhagem ancestral à *A. altiparanae*, a primeira linhagem divergente da bacia do Alto rio Paraná, e que faz parte do complexo “*bimaculatus*” com ampla distribuição na América do Sul. De acordo com estimativas do relógio molecular, a origem do gênero na bacia do Alto rio Paraná pode ter ocorrido por volta de 14 Ma durante o Miocênio (Figura 2); 2- recente dispersão/origem das demais espécies do gênero no Alto Paraná com tempo estimado por volta de 1.8 Ma no início do Quaternário (Plistocênio) (Figura 2). Essa recente dispersão da segunda linhagem de *Astyanax* no Alto rio Paraná reflete a grande diversidade de espécies e formas na bacia, que é reconhecida como de alto grau de endemismo. Neste contexto, os eventos cladogenéticos responsáveis pelo surgimento de novas espécies ocorreram recentemente e foram suficientes para determinar diferenças morfológicas identificáveis entre determinadas espécies com alta divergência genética, como entre *A. fasciatus* e *A. bockmanni* (2.6%) ou baixa divergência como entre *A. fasciatus* e *A. biotae* (0.5%). Por outro lado, esses recentes eventos de especiação não foram suficientes para diferenciarem do ponto de vista

morfológico as várias linhagens observadas de *A. paranae*, que não forma uma unidade monofilética na bacia e pode ser considerada como um complexo de espécies.

No presente estudo *A. paranae* se mostrou polifilética com ocorrência de sete linhagens (A-G). Excluindo-se a linhagem F representada pela população da localidade tipo, e a linhagem G que possui cerca de 99.8% de similaridade com *A. biotae*, as cinco linhagens restantes (A-E) podem ser indicadas como possíveis novas espécies. No entanto, a presença do clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C com 99,7% de identidade sugere que as populações analisadas possam representar a mesma unidade taxonômica, embora a população de *A. paranae* C seja da bacia do Alto rio Paranapanema (Alto Paraná) e *A. scabripinnis* da bacia costeira do Leste (região de Bertioga/SP). Esses dados representam mais um exemplo de conexão de ictiofauna entre bacias costeiras e o cristalino superior (ver RIBEIRO, 2006).

O presente trabalho, ao mostrar que *A. paranae* não forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, corrobora os resultados encontrados por Javonillo e colaboradores (2010), que visavam estabelecer relações entre as maiores linhagens de caracídeos. Esses autores, ao utilizarem três genes mitocondriais (12S, 16S e COI) e um gene nuclear (RAG 2) para a construção de filogenias baseadas em modelos *Bayesianos* e de *Parcimônia*, rejeitaram o monofiletismo de alguns grupos, dentre eles, *Astyanax*. Outro importante suporte para essa hipótese é a ocorrência de alta diversidade cariotípica em *A. paranae*, com a presença de três números diplóides distintos $2n=46$, 48 e 50 cromossomos (ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002). Os resultados obtidos por Calcagnotto e colaboradores (2005), utilizando dois genes mitocondriais (16S e *Cit-b*) e quatro genes nucleares (RAG 2, *sia*, *fkx* e *trop*), também corroboram com o não-monofiletismo de *Tetragonopterinae*, aqui representado pelas espécies de *Astyanax*. Porém, esses dados apontam para a probabilidade de que subgrupos monofiléticos possam ser recuperados em futuras análises, como indicado pelo clado recuperado formado por *Astyanax*, *Astyanacinus*, *Moenkhausia*, *Inpaichthys*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* no mesmo estudo. No entanto, Mirande (2009) ao construir sua hipótese filogenética baseada em 360 caracteres morfológicos de 160 espécies de caracídeos, aponta que o gênero *Astyanax* pode ser diagnosticado como monofilético com a inclusão de espécies de outros gêneros, como *Hyphessobrycon* e *Bryconamericus*.

Outra importante evidência observada no presente trabalho foi o relacionamento filogenético entre as espécies do grupo III, *A. janeiroensis* (Rio Ribeira) e *Astyanax* sp. D

(Rio Iguaçu/ Baixo rio Paraná), que representam o grupo irmão da linhagem do Alto Paraná, exceto *A. altiparanae*, e que compartilham um ancestral comum que divergiu a cerca de 4 Ma, entre o Pliocênio e o Plistocênio (Figura 2). O fato de *Astyanax* sp. D e *A. janeiroensis* formarem uma unidade monofilética, sugere que o gênero *Astyanax* para a bacia do rio Paraná não deve representar um grupo natural, e assim como para a bacia do Alto rio Paraná, possui uma história de mais de uma origem e sugere ainda a ocorrência de uma conexão antiga entre a bacia do rio Ribeira e Iguaçu, assim como se observa para outras espécies de peixes como *Trichomycterus davisii* (Siluriformes: Trichomycteridae) (INGENITO et al., 2004), *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae) (OYAKAWA et al., 2005) e *Rhamdiopsis moreirai* (Siluriformes: Heptapteridae) (BIZERRILL e LIMA, 2000).

A evidência de que *A. altiparanae* (grupo II) represente o grupo irmão primitivo do grupo III (*A. janeiroensis* + *A. sp. D*) e grupo IV (*Astyanax* do Alto Paraná), sugere que o ancestral comum para este clado estava presente na bacia do Alto rio Paraná a cerca de 14Ma (Miocênio), indicando que a colonização das espécies do grupo III (rio Ribeira e rio Iguaçu) tenha ocorrido a partir do Alto rio Paraná. Por outro lado, a posição basal do clado formado por *A. parahybae* (Rio Paraíba do Sul) e *A. ribeirae* (Rio Ribeira) para as demais espécies de *Astyanax* analisadas da bacia do Alto rio Paraná (grupo II e IV) e do baixo rio Paraná (rio Iguaçu: grupo III) e rio Ribeira (grupo III), sugere que espécies oriundas de bacias costeiras correspondem à primeira linhagem divergente do gênero *Astyanax*, quando se comparam espécies do cristalino superior (Alto rio Paraná) e de bacias costeiras do Leste (Ribeira, Paraíba do Sul, etc). Os fatos indicam que para a área de estudo, o ancestral comum das espécies analisadas se encontrava na bacia costeira a cerca de 17Ma ainda durante o Miocênio e, posteriormente, colonizou o cristalino superior. Esses dados são suportados pelas evidências de que o Alto Paraná era conectado a bacias costeiras do Leste a cerca de 20Ma (LUNDBERG et al., 1998), e encontram exemplos desta relação filogenética em Ribeiro (2006). Considerando o grupo dos caracídeos, pode-se citar como exemplo o gênero *Spintherobolus* (Characiformes: Cheirodontine) com três espécies (*S. broccae*, *S. leptoura* e *S. ankoseion*) distribuídas ao longo dos rios costeiros entre a Baía de Guanabara/RJ e o litoral norte do Estado de Santa Catarina. Essas espécies formam um clado, que é o grupo-irmão de *S. papilliferus*, conhecido por habitar apenas a nascente do rio Tietê (WEITZMAN e MALABARBA, 1999). Outro exemplo dentro desse grupo são os membros da subfamília Glandulocaudinae, tribo Glandulocaudini. As espécies de *Mimagoniates* difundem-se

preferencialmente ao longo das bacias costeiras, mas seu grupo-irmão, o gênero *Glandulocauda* é endêmico do escudo cristalino (Alto rio Tietê e Iguaçu-sudeste Brasil) (WEITZMAN et al, 1988; WEITZMAN e MENEZES, 1998). O gênero monotípico *Lophiobrycon* é grupo-irmão desses outros dois gêneros, sendo também endêmico da porção sudeste do escudo cristalino (parte média do Rio Grande) (CASTRO et al., 2003).

Ainda de acordo com Ribeiro (2006), os eventos de cladogênese entre bacias costeiras e terras altas do escudo cristalino estão em curso por longos períodos de tempo, originando padrões filogeneticamente semelhantes entre grupos irmãos em diferentes escalas de tempos e que essas diferenças de abrangência entre grupos-irmãos provavelmente refletem processos de vicariância contínua. As relações entre representantes de bacias costeiras e das áreas adjacentes do escudo podem ocorrer desde níveis muito inclusivos (relações entre subfamílias) passando por níveis intermediários (relações entre gêneros) aos níveis menos inclusivos onde se compartilham populações da mesma espécie (padrões designados por padrão A, B, e C, respectivamente). No caso dos *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná, os dados obtidos parecem estar mais relacionados ao padrão biogeográfico B, de acordo com Ribeiro (2006), uma vez que a relação entre bacia costeira e escudo cristalino se dá ao nível de gênero.

No estudo realizado por Ornelas-García e colaboradores (2008), usando sequências de DNA mitocondrial (Cit-b, COI e 16 S) e nuclear (RAG-1) com o intuito de se desenvolver uma hipótese filogenética robusta para o gênero *Astyanax* na América Central e estabelecer suas relações com *Bramocharax*, os resultados mostraram que todas as análises suportavam o monofiletismo de *Bramocharax* e *Astyanax*, deste modo, o gênero *Astyanax* é considerado monofilético na Mesoamérica se considerarmos as espécies de *Bramocharax* como sendo morfótipos de *Astyanax*. Nesse trabalho os autores ainda mostraram que *A. mexicanus* e *A. fasciatus* são complexos de espécies na América Central e México, tendo sido identificadas ao menos 7 novas espécies e reduzido a área de distribuição das duas.

Estes dados, em complemento aos resultados encontrados no presente trabalho, são um indicativo de que as relações evolutivas dentro de *Astyanax* não estão completamente definidas, e que estratégias de buscar resolver as relações filogenéticas das espécies do gênero inicialmente dentro das bacias hidrográficas poderá trazer mais benefícios do que se tentar estabelecer as relações filogenéticas diretamente das mais de 140 espécies do gênero.

4.2. Análise filogeográfica comparativa entre *A. paranae* e demais espécies de *Astyanax*

O fato da ictiofauna Neotropical ser reconhecidamente diversa, torna sua biogeografia pouco estudada. Segundo Vari e Weitzman (1990), três fatores são limitantes na precisão de hipóteses acerca da história biogeográfica dos peixes de água doce da América do Sul: 1) o pobre conhecimento da sistemática em nível de espécie na maioria dos táxons; 2) informações inadequadas sobre a distribuição da maioria das espécies; 3) pouca ou nenhuma informação sobre a história filogenética da maioria de táxons supraespecíficos. Segundo Ribeiro (2006) há ainda mais um fator agravante; as dificuldades em se associar hipóteses filogenéticas e a história geológica do continente. Ainda segundo esse autor, a maioria das informações disponíveis sobre a biogeografia de peixes de água doce Neotropicais vem de dados filogenéticos derivados de trabalhos de revisão de determinados grupos, em que foram feitas tentativas de esclarecer o relacionamento entre as áreas de endemismo, baseado em análises do cladograma de área (VARI, 1988; SCHAEFER, 1997; REIS, 1998; VARI e HAROLD, 2001; COSTA, 2001). Quando disponíveis, as inferências geológicas nestes estudos foram feitas com base em grandes eventos geológicos bem estabelecidos, como a elevação da Cordilheira dos Andes, enquanto que outros eventos não foram abordados. Devido a essas dificuldades, a filogeografia em peixes, sobretudo em *Astyanax*, ainda é pouco abordada.

No presente trabalho, as análises filogeográficas mostraram consistência com as análises filogenéticas, uma vez que todos os agrupamentos observados nas topologias foram recuperados nas redes de haplótipos, sobretudo para *A. paranae*, confirmando que a espécie não representa uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, e que as linhagens identificadas estão mais relacionadas a outras espécies de *Astyanax*, fazendo com que análises filogeográficas comparativas fossem possíveis. Nesse sentido, entre os clados *A. paranae* os indivíduos do clado *A. paranae* A (Tabela 3, Figura 3) foram os que apresentaram maior número de haplótipos e, apesar do haplótipo sp1 C ter maior ocorrência e estar presente tanto na bacia do rio Tietê quanto na do rio Paranapanema, ele é mais frequente nesse último rio, indicando que talvez a expansão desse clado tenha ocorrido a partir dessa bacia. Embora o clado *A. paranae* A seja mais relacionado a *A. paranae* B, a divergência de 2.03% e o não compartilhamento de haplótipos, mostrou as duas redes de haplótipos independentes, o que sugere que o isolamento do indivíduo 544PPtib dos demais *A. paranae* A da bacia do rio Paranapanema (Figura 2) possa representar a ocorrência de espécies distintas.

No clado *A. bockmanni*, a bacia do rio Tietê apresentou maior abundância de haplótipos (sete), embora o número de populações analisadas tenha sido maior para essa bacia. O único haplótipo compartilhado entre as bacias do rio Tietê e Paranapanema foi o Ab H, sugerindo que a colonização de *Astyanax bockmanni* na bacia do rio Paranapanema é recente em relação ao rio Tietê e pode ter ocorrido a partir dessa região. Os clados *A. bockmanni* + *A. scabripinnis* + *A. paranae* C apenas compartilham o haplótipo ancestral (Ab A), indicando que a origem do clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C é relativamente recente e, provavelmente, compartilha ancestral comum com *A. bockmanni* (Figura 3). Analisando a porcentagem de divergência entre esses dois clados, observou-se que a mesma é pequena (1.08%) (Tabela 2), mostrando que esses grupos que compartilham o mesmo haplótipo ancestral são relacionados.

Os clados *A. paranae* D e *A. paranae* E mostraram uma rede desconectada (Figura 3), apesar de possuírem representantes da mesma localidade (Uberlândia/MG). A análise de mais populações é de fundamental importância para uma correta abordagem filogeográfica, já que a análise do clado *A. paranae* D se deu apenas para uma população. No entanto, os resultados parecem indicar a ocorrência de espécies distintas em simpatria nesta bacia, o que é reforçado pela divergência de 2.19% (Tabela 2).

A rede dos clados *A. paranae* F + *A. biotae* + *A. paranae* G + *A. fasciatus* foi a que se mostrou mais conectada (Figura 3). Os clados *A. biotae* + *A. paranae* G compartilham o mesmo haplótipo ancestral (sp6 A), sendo mais um indicativo, juntamente com a baixa distância genética (0.21%) e posição na árvore (agrupados em um único clado), de que sejam representantes de uma mesma espécie. O clado *A. fasciatus* foi o que apresentou maior riqueza de haplótipos dentre os *Astyanax*, apresentando posição central entre as duas outras redes. Apesar de não ter havido compartilhamento de haplótipos, a conexão da rede, bem como as poucas mutações ligando os haplótipos ancestrais dos clados em questão, sugerem que essas espécies provavelmente descendem de um mesmo ancestral comum recente, o que se reflete na pequena distância genética entre *A. fasciatus* e *A. paranae* F (0.77%) e *A. fasciatus* e *A. biotae* + *A. paranae* G (0.52%) (Tabela 2).

A análise de todas as redes de haplótipos permitiu concluir que, apesar de haver uma conexão entre algumas redes (Figura 3) não houve compartilhamento de haplótipos entre as diferentes espécies e/ou linhagens. Esse dado, apesar de sugerir a não ocorrência de fluxo gênico entre esses indivíduos, deve ser analisado de forma cuidadosa; uma vez que há a

presença de poucas mutações entre os haplótipos de espécies diferentes, indicando a presença de um ancestral comum recente. O baixo número de indivíduos analisados de algumas espécies ou linhagens pode também representar resultados não conclusivos. Por outro lado, pode ser evidenciado, mais uma vez, que *A. paranae* não forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, e que as linhagens observadas A-G (incluindo a tipo) não compartilham haplótipos entre si.

Zenatti (2006), analisando a filogeografia de populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão/SP com base no gene *Cit-b*, concluiu que a presença do haplótipo ancestral em duas bacias separadas pela Serra da Mantiqueira (Paraíba do Sul/Costeiro e Grande/Alto Paraná), corrobora com a hipótese de que essas populações estiverem em contato antes do soerguimento da serra e que a presença de haplótipos exclusivos, evidencia o isolamento geográfico das populações. No entanto, o soerguimento da serra se deu no final do Cretáceo (por volta de 80 milhões de anos (Ma)), muito tempo antes dos fósseis de Tetragonopterinae datados de 2 a 11 Ma terem sido encontrados por Travassos (1955). Portanto, seria mais plausível propor que a presença de haplótipos compartilhados seja devido a eventos de captura de cabeceiras. Além disso, um estudo mais abrangente seria requerido para uma inferência filogeográfica mais fidedigna, uma vez que a autora obteve seus resultados a partir de um fragmento do gene (688 pb) e de um número pequeno de indivíduos (25). Outro fator importante em relação ao trabalho se refere à correta identificação das espécies analisadas, uma vez que para a bacia do Paraíba do Sul estão descritas três espécies de *Astyanax* anteriormente identificadas como *A. scabripinnis* (*A. parahybae*, *A. intermedius*, *A. jenyensii*), enquanto na bacia do Alto Paraná apenas *A. paranae*. A ocorrência de haplótipos compartilhados entre as populações analisadas por Zenatti (2006), difere do nosso trabalho se assumirmos que as análises foram conduzidas em *A. parahybae*, que representa a linhagem mais divergente entre os *Astyanax* analisados no presente trabalho, nesse sentido, pode-se supor que as análises foram realizadas com representantes de outra espécie de *Astyanax* (*A. jenyensii* ou *A. intermedius*), e que assim como observado para alguns grupos no nosso trabalho (ex: *A. biotae* e *A. fasciatus*) a divergência entre as espécies deve ser muito recente.

Ornelas-García e colaboradores (2008) ao estudar o gênero *Astyanax* na Mesoamérica com base no gene *Cit-b* mostrou que as populações da América do Norte e a porção mais alta da América Central formavam um grupo monofilético, enquanto que as populações da porção

média da América Central mostravam evidências de rápida radiação com relações não resolvidas. As linhagens da porção baixa da América Central mostraram uma estrutura fragmentada, com táxons geograficamente restritos apresentando altos níveis de divergência molecular. Assim, esses pesquisadores levantaram a hipótese de ocorrência de outras espécies de *Astyanax* para a América Central, reduzindo a área de distribuição de *A. fasciatus* e *A. mexicanus*, sugerindo revalidação de alguns grupos e inclusão de novas espécies. O fato de *A. fasciatus* e *A. mexicanus* terem tido sua área de distribuição reduzida e o reconhecimento de espécies novas se assemelha ao nosso trabalho, já que foram encontradas diferentes linhagens para *A. paranae*. A hipótese levantada por Ornelas-García e colaboradores (2008) é contrária à levantada por Strecker et al. (2004), que determina que na América Central deva ocorrer apenas a espécie *A. fasciatus*, sendo considerada sinônima de *A. mexicanus* (peixe cavernícola).

4.3. Implicações taxonômicas em *Astyanax* para o Alto rio Paraná

Como mencionado anteriormente, a região do Alto rio Paraná é particularmente interessante para estudos de ictiofauna, pois abrange cerca de 310 espécies de peixes distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007). Levantamentos recentes, principalmente no Estado de São Paulo (CASTRO e CASATTI 1997, CASATTI et al. 2001, CASTRO et al. 2003, 2004, 2005, LANGEANI et al. 2005a,b) indicam a presença de uma fauna diversificada, mostrando que cerca de 6 a 15 % das espécies referidas são novas (CASTRO et al. 2003, 2004, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados ao se revisar as coleções ictiológicas, salientando que os inventários feitos nessa bacia são incompletos (AGOSTINHO e GOMES, 2005), o que mostra a importância de estudos mais abrangentes, que envolvam não apenas análises de material coletado na natureza, como uma revisão nos materiais já depositados em coleções (LANGEANI et al., 2007).

Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam mais uma vez a necessidade de um amplo estudo taxonômico na bacia do Alto rio Paraná e uma revisão cuidadosa das coleções. A partir das análises filogenéticas e filogeográficas, evidenciou-se que a espécie *A. paranae* não forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, sugerindo que os indivíduos classificados anteriormente como pertencentes a essa espécie, devam, possivelmente, representar espécies novas, uma vez que ao se analisar as topologias das árvores, aqui representada pela árvore consenso (Figura 2) bem como as distâncias

genéticas (Tabela 2) e redes de haplótipos (Figura 3), foi possível identificar sete diferentes grupos (A-G), incluindo a localidade tipo.

Desta forma, sugerimos alterações na taxonomia do gênero com a possível inclusão de espécies e a revisão de outras para a bacia do Alto rio Paraná (Figura 5). Deste modo, o clado *A. paranae* A passe a ser identificado como *Astyanax* sp. 1, agrupando a maior área de distribuição na bacia do Alto rio Paraná (rio Tietê, Paranapanema, Grande). O clado *A. paranae* B representado apenas por um indivíduo (544 PPTib) que encontra-se isolado dos demais grupos, cujo haplótipo está desconectado da rede de seu grupo irmão (Figura 3) e que possui uma distância genética de 2.03% quando comparado com os restantes *Astyanax* sp. 1 deve representar uma nova espécie na bacia do rio Paranapanema, como sugerido por O. Shibatta (comun. pessoal), denominada aqui de *Astyanax* sp. 2. Apesar dessa distância estar subestimada devido à análise de apenas um exemplar, há indícios moleculares e morfológicos que sustentam essa hipótese.

Para o clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C, de acordo com análises filogenéticas e filogeográficas, bem como a baixa divergência genética entre os indivíduos identificados como *A. scabripinnis* e os *A. paranae* C (0.36%), parece indicar que as populações representem a mesma espécie. No entanto, *A. scabripinnis* por ser considerada um complexo de espécies por vários autores, seja com dados morfológicos (BERTACO e MALABARBA, 2001) ou cromossômicos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), tem sido alvo de constantes revisões morfológicas com o reconhecimento de sete espécies por Bertaco e Malabarba (2001). No entanto, a ocorrência de *A. scabripinnis* em riachos costeiros no Rio de Janeiro (localidade tipo) parece indicar que essa espécie esteja restrita a bacia costeira do Leste, assim o clado *A. scabripinnis* + *A. paranae* C poderia representar *A. scabripinnis* ou uma nova espécie do grupo “*scabripinnis*”, ou ainda, do ponto de vista mais conservacionista, este clado representaria duas espécies: *A. scabripinnis* (costeiro) e uma nova espécie de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paranapanema (*Astyanax* sp. 3), com divergência genética baixa indicando recente processo cladogênico entre as duas espécies, evitando deste modo assumir que uma única espécie teria distribuição tanto em riachos costeiros como em rios do Alto rio Paraná. A ausência de haplótipos compartilhados entre as duas populações pode ser um indicativo para suportar a segunda hipótese.

Os cladogramas *A. paranae* D: formado por populações do rio Paranaíba; e *A. paranae* E: formado por populações do rio Paranaíba e Grande; representam as linhagens mais

divergentes do Grupo IVa, sendo *A. paranae* E o grupo irmão dos grupos A+B+C+D. O fato de na bacia do rio Paranaíba ocorrer três linhagens distintas D, E, G indicando que *A. paranae* representa três distintas unidades nesta bacia do Alto rio Paraná, concorda com evidências morfológicas obtidas por Tavares (2007), que em uma revisão para o gênero *Astyanax* no Alto rio Paraná, também sugere a ocorrência de 3 espécies novas na bacia e todos com distribuição nas bacias dos rios Paranaíba e Grande. A ausência de haplótipos compartilhados entre os clados D e E, e a divergência de 2.19%, aliado as informações morfológicas indicam que os dois clados devem ser denominados de *Astyanax* sp. 4 e *Astyanax* sp. 5, respectivamente. O fato da ocorrência de uma espécie de *Astyanax* para a bacia do rio Paranaíba (*A. paranahybae*) não altera a hipótese do presente trabalho, uma vez que de acordo com Malabarba e Weitzman (2003), esta espécie deva ser um representante do gênero *Bryconamericus*.

O clado *A. paranae* G formado por populações da bacia do rio Paranapanema e rio Paranaíba, devido à baixa distância genética (0.21%) e a presença de apenas um par de bases diferente entre o haplótipo ancestral e *A. biotae*, são evidências que suportam a hipótese de que o clado G deve ser classificado como representantes da espécie *A. biotae*, que foi descrita para a bacia do rio Paranapanema, próximo a localidade da mesma bacia do clado G. Em relação ao clado F, este é formado por representantes da localidade tipo na bacia do rio Tibagi, próximo a Castro/PR, na bacia do rio Paranapanema, nesse sentido, as populações desse clado são as únicas do ponto de vista taxonômico a representar a espécie *A. paranae*. No entanto, informações de pesquisadores que analisaram o material O. Shibatta (UEL, Londrina/PR) e R. Bristke (UNESP, Botucatu/SP), ressaltam que embora possam ser identificados como *A. paranae* os exemplares não possuem todos os caracteres diagnósticos do grupo, que por outro lado não está bem estabelecido, e sugerem com base nas evidências morfológicas e moleculares que a definição de *A. paranae* deve ser revista.

Deste modo, os clados anteriormente citados devem constituir possivelmente cinco espécies para a bacia do Alto rio Paraná: *Astyanax* sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4 e sp. 5 (Figura 5), refutando a hipótese inicial do presente trabalho, uma vez que *A. paranae* parece não formar uma unidade monofilética para a bacia do Alto rio Paraná, podendo ser identificadas novas espécies com base nas análises moleculares. A utilização do gene mitocondrial ATPase como ferramenta complementar na identificação de espécies também foi evidenciada, mostrando

seu alto potencial taxonômico e no estabelecimento de relações filogenéticas em peixes Neotropicais, sobretudo em *Astyanax*.

Assim como a bacia do Alto rio Paraná, a bacia do Alto rio Iguaçu representa uma área de endemismo para o gênero *Astyanax*, sendo considerada um *hotspot* da biodiversidade global, como resultado de seu endemismo e diversidade de peixes de pequeno porte, com muitas espécies ameaçadas (ABILHOA e DUBOC, 2004). Os estudos desses *Astyanax*, semelhante ao que ocorre para o Alto rio Paraná, foram, por muito tempo, insuficientes para resolver sua taxonomia. Garavello e Sampaio (2010), ao utilizar uma série de caracteres morfológicos, descrevem a ocorrência de cinco novas espécies de *Astyanax* para a bacia do rio Iguaçu, que anteriormente haviam sido denominadas de *Astyanax* sp. B, C, D, E e F (SAMPAIO, 1988; AGOSTINHO et al., 2007).

Na tentativa de elucidar se as espécies reconhecidas como *Astyanax* correspondiam a grupos naturais na bacia do Iguaçu, Pie e colaboradores (2009), utilizaram a região controle D-loop. Esses pesquisadores evidenciaram através das relações filogenéticas que havia uma pobre correspondência entre os táxons de *Astyanax*, definidos por caracteres morfológicos, e sua monofilia, ou seja, parece haver uma clara discordância entre os caracteres morfológicos comumente utilizados para discriminar morfoespécies e os dados genéticos. Os autores sugerem duas explicações possíveis: ou os caracteres morfológicos utilizados pelos taxonomistas não são suficientes para discriminar essas espécies e, portanto pode não considerar a existência de espécies crípticas ou o intervalo de tempo entre os eventos de especiação têm sido insuficientes para a classificação de linhagens mitocondriais ou ambos.

Esses dados reforçam aqueles encontrados no presente estudo, uma vez que a existência de complexos de espécies com diversas espécies crípticas que são difíceis de se distinguir com base apenas na sua morfologia parece ser um padrão recorrente dentro de *Astyanax*, como sugerido por Artoni et al. (2006) para *A. aff. fasciatus*, por Moreira-Filho e Bertollo (1991) para *A. scabripinnis* e pelos resultados obtidos no nosso estudo, uma vez que, através do emprego de gene mitocondrial ATPase 6/8, *A. paranae* parece formar um complexo de espécies semelhante aos outros dois citados anteriormente, agrupando espécies a serem descritas.

Assim, a presença de, possivelmente, cinco novas espécies de *Astyanax* presentes na bacia do Alto rio Paraná indica mais uma vez a dificuldade na correta identificação taxonômica desse grupo que compreende indivíduos semelhantes morfologicamente,

sugerindo um estudo combinado entre taxonomia e biologia molecular, para que possa ser recuperada a história evolutiva das espécies de *Astyanax*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILHOA, V. e DUBOC, L. F. Peixes. In: MIKICH, S. B. e BÉRNILS, R. S.(Ed.). **Livro Vermelho dos Animais Ameaçados de Extinção no Estado do Paraná**. Curitiba: Mater Natura e Instituto Ambiental do Paraná, 2004, p. 581–678.

AGOSTINHO, A.A. e GOMES, L.C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do Alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R. e JORCIN, A. (Org.). **Ecologia de reservatórios, impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Rima Editora, 2005, p. 23-55.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. e PELICICE, F. M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007.

ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) with $2n=48$ chromosomes. **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.

ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C. DE; VICARI, M. R. e BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology** v. 4, 197–202, 2006.

BERMINGHAM E.; MCCAFFERTY, S.S.; MARTIN, A.P. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: KOCHER, T.; STEPIEN, C.A. (Ed.). **Molecular Systematics of Fishes**. San Diego, CA: Academic Press, 1997, p. 113-128.

BERTACO, V.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 1, p. 25-30, 2007.

BERTACO, V.; MALABARBA, L.R. Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of the Southern Brazil, with comments on the *A. scabripinnis* species complex. **Ichthyology Exploration of Freshwaters**, v. 12, n. 3, p. 221-234, 2001.

BIZERRIL, C. R. S. F. e LIMA, N. R. W. Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 22, n. 1, p. 103–110, 2000.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A. E DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 135–153, 2005.

CASATTI, L.; LANGEANI, F. e CASTRO, R.M.C. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná. **Biota Neotropical** v. 1(1,2), 2001. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v1n12/pt/abstract?article+BN00201122001> >

CASTRO, R.M.C. e CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 7, n. 4, p. 337-352, 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, R. M. C., et al. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, n. 3, p. 193-214, 2005.

COSTA, W. J. E. M. The Neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 12, n. 4, p. 333–383, 2001.

ESCHMEYER, W.N. e FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**, 2011.

Disponível em:

< <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> >

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.

GARAVELLO, J.C. e SAMPAIO, F.A.A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 847-865, 2010.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. R. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v.17, p. 754–755, 2001.

INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F. e ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2004.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S.H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p.498–511, 2010.

LANGEANI, F.; CASATTI, L.; GAMEIRO, H.S.; BELLUCCO-DO-CARMO, A. e ROSSA-FERES, D.C. Riffle and pool fish communities in a large stream of southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 2, p. 305-311, 2005a.

LANGEANI, F.; LUCENA, Z.M.S.; PEDRINI, J. e TARELHO-PEREIRA, F.J. *Bryconamericus turiuba*, a new species from the upper rio Paraná system (Ostariophysi: Characiformes). **Copeia** v. 2005, n. 2, p. 386-392, 2005b.

LANGEANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, bn03407032007, 2007.

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L. e WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. e LUCENA, C. A. S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998, P. 13–48.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p. 201-206, 1998.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 365-369, 2000.

MALABARBA, L.R. e WEITZMAN, S.H. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, v.16, p. 67–151, 2003.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

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.

MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, p. 1-40, 2009.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

ORNELAS-GARCÍA, C.P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in

Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**. v.8: 340, 2008.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A. e ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Ribeira de Iguape basin, with descriptions of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 921, p. 1–27, 2005.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular evolution: A phylogenetic approach**. UK: Blackwell Science, 1998.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 25, p. 172-189, 2002.

PIE et al. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçu River. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2357–2362, 2009.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E. L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabribinnis* paranae in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 377-380, 1997.

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

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n.3, p. 225-246, 2006.

REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.124, n. 2, p. 105–168, 1998.

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

SAMBROOK, J **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher., 2001.

SAMPAIO, F. A. A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da Bacia do Rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna**. São Carlos (SP). MSc Thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil, 1988.

SCHAEFER, S. A. The neotropical cascudinhos: Systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 148, p. 1–120, 1997.

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 Phylogenetic and Evolution**, v. 33, p. 469-481, 2004.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta**, 2002. Disponível em: <<http://www.sinauer.com/detail.php?id=8060>>.

TAVARES, D.O. *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) do Sistema do Alto rio Paraná: taxonomia. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, v. 117, p. 343–351, 1987.

TRAVASSOS, H. e SANTOS, R. S. **Caracídeos fósseis da bacia do Paraíba**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, D. F. e divisão de Geologia e Mineralogia do Departamento Nacional de produção Mineral, R. J., D. F., 1955.

VARI, R. P. 1988. The Curimatidae, a lowland neotropical family (Pisces: Characiformes): Distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In: VANZOLINI, P. E. e HEYER, W. R. (Ed.). **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p. 313–348.

VARI, R. P. e HAROLD, A. S. Phylogenetic study of the neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the cis-andean species. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 613, p. 1–239, 2001.

VARI, R. P. e WEITZMAN, S. H. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. In: PETERS, G. e HUTTERER, R. (Ed.). **Vertebrates in the Tropics**. Proceedings of the International Symposium on Vertebrate Biogeography and Systematics in the Tropics, Bonn, 1990. Alexander Koenig Zoological Research Institute and Zoological Museum, Bonn, p. 381-393.

XIA, X. e XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.

ZENATTI, P. P. 2006. **Análise Filogeográfica de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) da região de Campos do Jordão (SP)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 86p.

WEITZMAN, S. H. e MALABARBA, L. R. Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from eastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.10, n. 1, p. 1-43, 1999.

WEITZMAN, S. H. e MENEZES, N. A. Relationships of the tribes and genera of the *Glandulocaudinae* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new

genus, *Chrysobrycon*. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P., LUCENA, Z. M. S. e LUCENA, C. A. S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998, p. 171-192.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A. e WEITZMAN, M. J. Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: VANZOLINI, P. E. e HEYER, W. R. (Ed.). **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p. 379-427.

Tabela 1.: Lista dos indivíduos amostrados de acordo com espécie, localização e diversidade de haplótipos.

Nº LGP	BACIA	SUB-BACIA	POPULAÇÃO	HAPLÓTIPO
<i>Astyanax</i> sp. 1 (<i>A. paranae</i> A)				
918♦	Rio Tietê	Rib. Barra Seca (Bauru/SP)	TTbs	sp1 A
935♦	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	sp1 A
936♦	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	sp1 C
944♦	Rio Tietê	Rib. Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	sp1 A
439*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	sp1 C
440*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	sp1 C
746♦	Rio Paranapanema	Rib. Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	sp1 C
747♦	Rio Paranapanema	Rib. Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	sp1 C
751♦	Rio Paranapanema	Rib. Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	sp1 C
752♦	Rio Paranapanema	Rib. Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	sp1 C
924♦	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb	sp1 C
926♦	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb	sp1 D
928♦	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb	sp1 D
1026*	Rio Paranapanema	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap	sp1 C
1028*	Rio Paranapanema	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap	sp1 C
957♦	Rio Tietê	Rib. Marapuama (Bauru/SP)	TTmarap	sp1 C
477*	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg	sp1 L
478*	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg	sp1 B
479*	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg	sp1 K
480*	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg	sp1 L
481*	Rio Tietê	Rib. Canta Galo (Rio Claro/SP)	TTcg	sp1 K
369*	Rio Tietê	Rib. Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc	sp1 E
374*	Rio Tietê	Rib. Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc	sp1 F
539*	Rio Grande	Rib. Mocoquinha (Cajuru/SP)	GDmoc	sp1 G
541*	Rio Grande	Rib. Mocoquinha (Cajuru/SP)	GDmoc	sp1 H
555*	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms	sp1 J
556*	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms	sp1 I
557*	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms	sp1 J
558*	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms	sp1 I
559*	Rio Paranapanema	Rib. Maria da Serra (Ponta Grossa/PR)	PPms	sp1 J
<i>Astyanax</i> sp. 2 (<i>A. paranae</i> B)				
544*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi/PR	PPtib	sp2 A
<i>Astyanax</i> <i>scabripinnis</i>				
952	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert	sp3 A
953	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert	sp3 A
954	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert	sp3 B
955	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert	sp3 A
956	Costa Leste	Bertioga/SP	CLbert	sp3 A
<i>Astyanax</i> sp. 3 (<i>A. paranae</i> C)				
1027*	Rio Grande	Córrego do Chapéu (Rib. Grande/SP)	PPchap	sp3 C
438*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	sp3 D
441*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	sp3 D
901*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPvb	sp3 E
<i>Astyanax</i> <i>bockmanni</i>				
442*	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc	Ab C
445*	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc	Ab G

446*	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc	Ab F
447*	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc	Ab F
448*	Rio Tietê	Cascatinha (Botucatu/SP)	TTcasc	Ab F
504*	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp	Ab D
505*	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp	Ab A
506*	Rio Tietê	Paranapiacaba/SP	TTpp	Ab A
841*	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Ab E
842*	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Ab I
843*	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Ab E
844*	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Ab E
461	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Ab B
462	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Ab B
463	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Ab B
464	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Ab B
465	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Ab B
934	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	Ab H
943	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	Ab H
945	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	Ab H
946	Rio Tietê	Campo Novo (Bauru/SP)	TTcn	Ab H
534*	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap	Ab H
535*	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap	Ab H
536*	Rio Paranapanema	Córrego Hortelã (Botucatu/SP)	PPchap	Ab H
<i>Astyanax</i> sp. 4 (<i>A. paranae</i> D)				
1638*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp4 A
1644*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp4 A
1669*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp4 A
s/n° 0*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp4 A
<i>Astyanax</i> sp. 5 (<i>A. paranae</i> E)				
1002*	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb	sp5 A
1003*	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb	sp5 A
1004*	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb	sp5 A
1005*	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb	sp5 A
1006*	Rio Paranaíba	Córrego Tamborete (Capitólio/MG)	Ptamb	sp5 A
1653*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp5 C
1675*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp5 C
1676*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp5 C
1677*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp5 C
517*	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3	sp5 B
518*	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3	sp5 B
519*	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3	sp5 B
520*	Rio Grande	Rio Itajubá/MG (Pto 3)	GD3	sp5 B
521*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2	sp5 D
522*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2	sp5 E
523*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2	sp5 E
524*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 2)	GD2	sp5 E
<i>Astyanax paranae</i> (<i>A. paranae</i> F)				
993*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast	Ap F
994*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast	Ap E
995*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast	Ap A
996*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast	Ap B
997*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castro/PR)	PPcast	Ap A
546*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolândia/PR)	PPc	Ap G

547*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolanda/PR)	PPc	Ap D
548*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolanda/PR)	PPc	Ap H
549*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Castrolanda/PR)	PPc	Ap C
<i>Astyanax biotae</i>				
947	Rio Paranapanema	Córrego Água Mole (Diamantina do Norte/PR)	PPbio	Abio A
948	Rio Paranapanema	Córrego Água Mole (Diamantina do Norte/PR)	PPbio	Abio A
<i>Astyanax</i> sp. 6 (<i>A. paranae</i> G)				
551*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb	sp6 A
553*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb	sp6 C
554*	Rio Paranapanema	Rio Tibagi (Cambé/PR)	PPcb	sp6 C
1692*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	sp6 B
<i>Astyanax fasciatus</i>				
513*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1	Af L
514*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1	Af N
515*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1	Af D
516*	Rio Grande	Rio Muzambinho/MG (Pto 1)	GD1	Af K
1011*	Rio Paranaíba	Córrego s/nome (Rio Verde/GO)	Prv	Af M
852	Rio Grande	Rio Mogi-Guaçu (Porto Ferreira/SP)	GDmg	Af J
33	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Af B
36	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Af I
927♦	Rio Paranapanema	Rio Alambari (Bauru/SP)	PPalamb	Af E
878*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma	Af A
879*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma	Af A
880*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma	Af A
881*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma	Af A
882*	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (São Miguel Arcanjo/SP)	PPsma	Af A
14	Rio Tietê	Rib Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc	Af B
91	Rio Tietê	Rib Passa cinco (Rio Claro/SP)	TTpc	Af F
475	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	Af C
476	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (Itapetininga/SP)	PPitap	Af G
1687*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	Af H
1690*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	Af H
1078*	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai	Af E
1079*	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai	Af E
1080*	Rio Paranapanema	Rio Ivaí (Cianorte/PR)	PPivai	Af E
<i>Astyanax altiparanae</i>				
458	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)	TTci	Aa D
459	Rio Tietê	Córrego Invernada (Penápolis/SP)	TTci	Aa E
31	Rio Tietê	Rib. Claro (Rio Claro/SP)	TTrc	Aa B
838	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Aa A
840	Rio Paranapanema	Rib.Véu de Noiva (Botucatu/SP)	PPvn	Aa A
1578*	Rio Paranaíba	Rio Uberlândia (Uberlândia/MG)	Pub	Aa C
<i>Astyanax ribeirae</i>				
788	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar A
789	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar B
790	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar B
791	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar C
792	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar C
805	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar B
806	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar C
808	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar B
809	Rio Ribeira	Rio Jacupiranguinha (Jacupiranga/SP)	Rjac	Ar B

<i>Astyanax janeiroensis</i>				
1014	Rio Ribeira	Rio Turvo (Cerro Azul/PR)	Rjan	Aj A
1017	Rio Ribeira	Rio Turvo (Cerro Azul/PR)	Rjan	Aj A
<i>Astyanax sp D</i>				
1036	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD C
1039	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD A
1040	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD B
1042	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD A
1043	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD A
1044	Rio Iguaçu	Rib. Serrinha (Balsa Nova/PR)	IspD	spD A
<i>Astyanax parahybae</i>				
874	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg	Aph B
875	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg	Aph A
876	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg	Aph B
877	Rio Paraíba do Sul	Rib. Grande (Pindamonhangaba/SP)	PSrg	Aph B
<i>Serrapinnus notomelas</i>				
905	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb	-
906	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb	-
908	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb	-
909	Rio Paranapanema	Rio Itapetininga (S. Miguel Arcanjo/SP)	PPvb	-
<i>Bryconamericus sp</i>				
998	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam	-
999	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam	-
1000	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam	-
1001	Rio Paranaíba	Córrego Gameleira (Corumbáiba/GO)	Pgam	-

** Notar que os indivíduos destacados com * haviam sido identificados anteriormente como *A. paranae* e os com ♦, como *A. bockmanni*. Entre parênteses encontra-se a denominação inicial por clados.

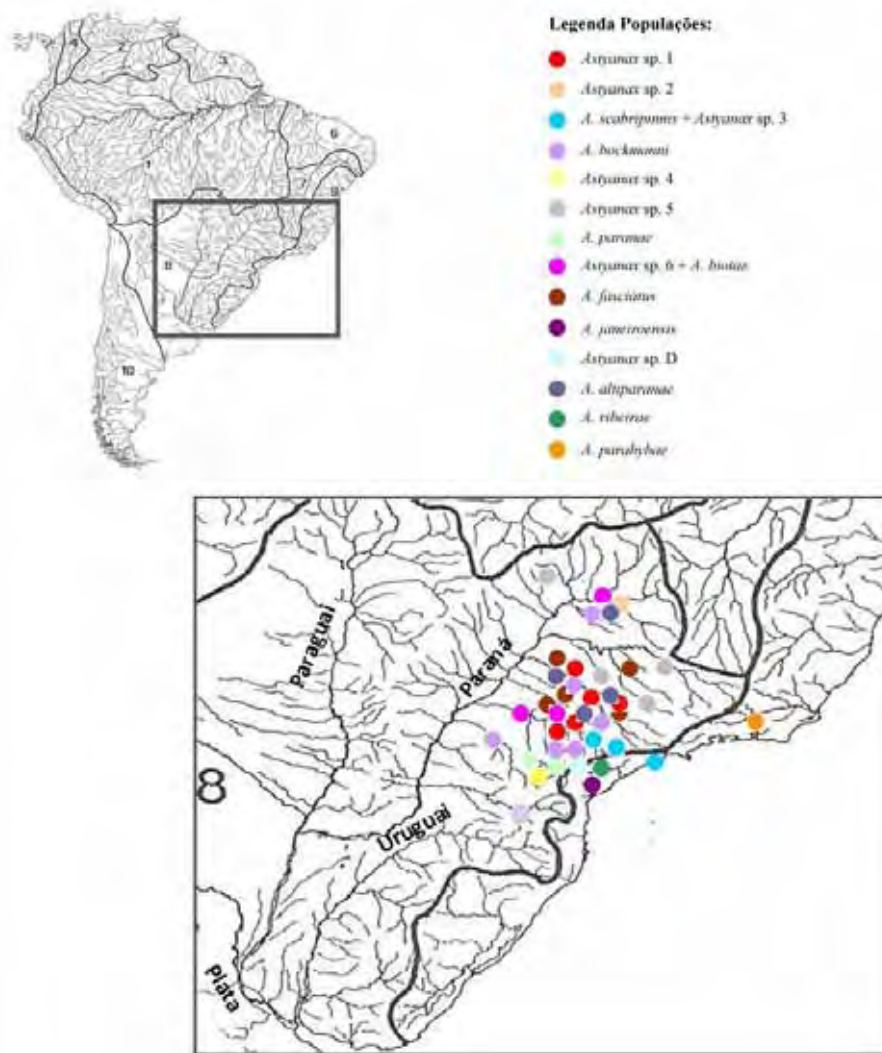


Figura 1.: Mapa da localização das espécies de *Astyanax* analisadas.

Legenda Clados:

- *A. paranae* A
- *A. paranae* B
- *Ascabripinnis* + *A. paranae* C
- *A. bockmanvi*
- *A. paranae* D
- *A. paranae* E
- *A. paranae* F
- *A. paranae* G + *A. biotae*
- *A. fasciatus*
- *A. janeiroensis*
- *Astyanax* sp. D
- *A. altiparanae*
- *A. ribeirae*
- *A. paraguaybae*

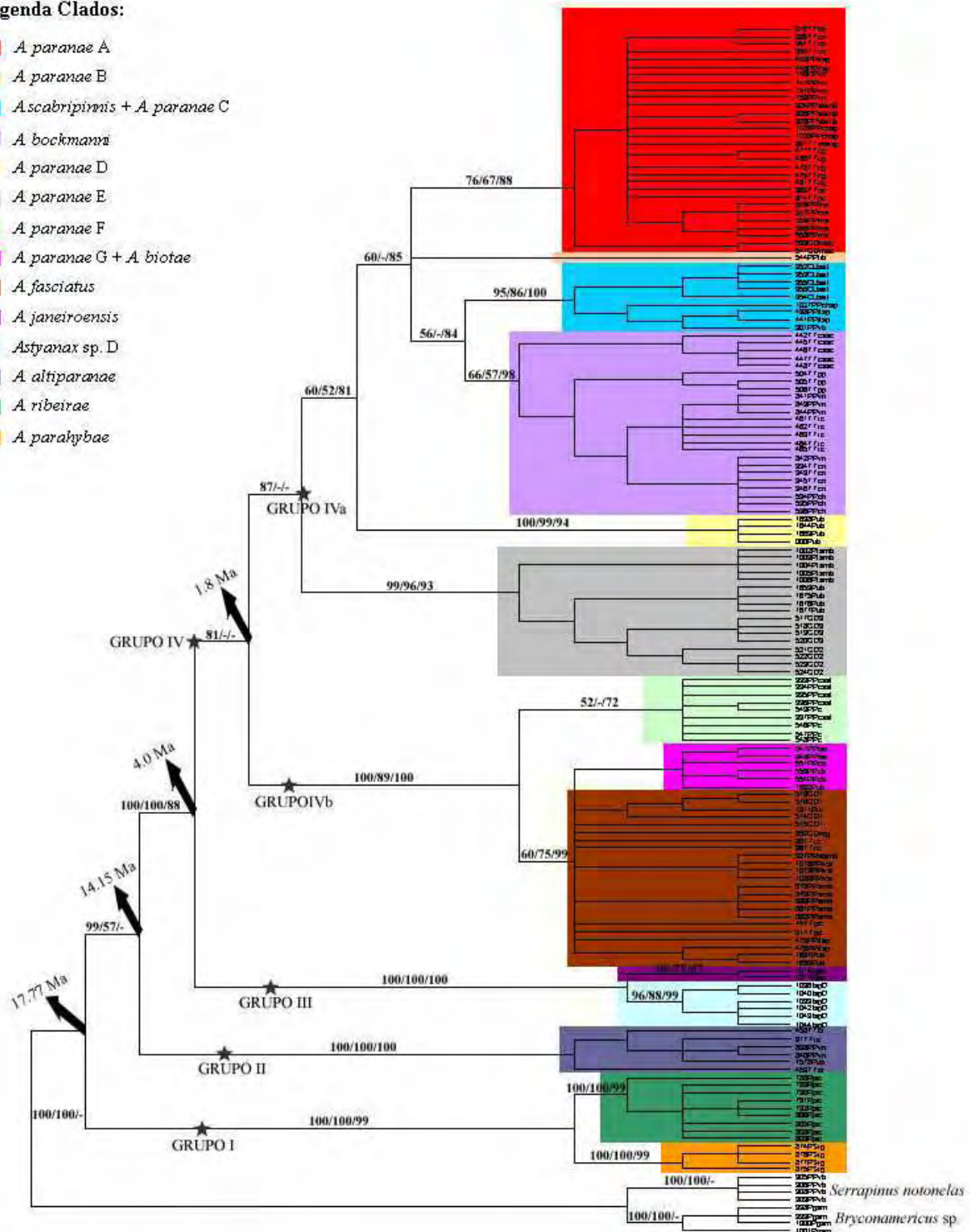


Figura 2.: Árvore consenso das espécies estudadas com base na sequência completa do gene mitocondrial ATPase 6/8. Os valores dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), para NJ e MP e as probabilidades posteriores para IB, respectivamente, que servem de suporte para os clados.

Tabela 2.: Distâncias genéticas e tempos de divergência entre as espécies estudadas

1. <i>A. paranae</i> A	1. <i>A. paranae</i> A	2. <i>A. paranae</i> B	3. <i>A. scabripinnis</i> + <i>A. paranae</i> C	4. <i>A. bockmanni</i>	5. <i>A. paranae</i> D	6. <i>A. paranae</i> E	7. <i>A. paranae</i> F	8. <i>A. biotae</i> + <i>A. paranae</i> G
		1.56 Ma	1.06 Ma	0.98 Ma	1.21 Ma	1.65 Ma	2.12 Ma	2.18 Ma
2. <i>A. paranae</i> B	002.03±000.11		1.75 Ma	1.62 Ma	2.10 Ma	2.27 Ma	2.70 Ma	2.74 Ma
3. <i>A. scabripinnis</i> + <i>A. paranae</i> C	001.38±000.24	002.27±000.24		0.83 Ma	1.29 Ma	1.64 Ma	2.00 Ma	2.05 Ma
4. <i>A. bockmanni</i>	001.28±000.16	002.11±000.10	001.08±000.27		1.40 Ma	1.63 Ma	1.90 Ma	1.97 Ma
5. <i>A. paranae</i> D	001.58±000.12	002.73±000.00	001.68±000.23	001.82±000.11		1.68 Ma	2.06 Ma	2.10 Ma
6. <i>A. paranae</i> E	002.15±000.27	002.95±000.33	002.13±000.25	002.12±000.30	002.19±000.31		2.04 Ma	2.26 Ma
7. <i>A. paranae</i> F	002.76±000.19	003.51±000.17	002.61±000.20	002.47±000.14	002.68±000.16	002.65±000.22		0.69 Ma
8. <i>A. biotae</i> + <i>A. paranae</i> G	002.84±000.12	003.56±000.08	002.67±000.15	002.56±000.12	002.73±000.07	002.94±000.17	000.90±000.18	
9. <i>A. fasciatus</i>	002.91±000.17	003.61±000.16	002.68±000.22	002.62±000.17	002.79±000.14	002.79±000.30	000.77±000.27	000.52±000.15
10. <i>A. altiparanae</i>	017.97±000.23	018.67±000.20	018.31±000.23	018.51±000.32	018.11±000.12	018.31±000.24	018.50±000.21	018.94±000.23
11. <i>A. ribeirae</i>	023.60±000.14	023.19±000.08	023.24±000.15	022.91±000.11	022.39±000.06	023.28±000.26	023.42±000.14	023.74±000.09
12. <i>A. janeiroensis</i>	003.62±000.09	004.51±000.00	003.67±000.19	003.76±000.10	003.44±000.00	004.02±000.27	003.43±000.13	003.80±000.07
13. <i>Asyanax</i> sp. D	003.74±000.10	004.61±000.05	003.77±000.19	003.63±000.11	003.78±000.05	004.36±000.27	003.53±000.14	003.90±000.08
14. <i>A. parahybae</i>	022.51±000.11	022.71±000.06	022.29±000.14	021.87±000.09	021.53±000.05	021.95±000.15	022.04±000.08	022.08±000.08
15. <i>Serrapinus notonelas</i>	024.65±000.12	025.42±000.00	024.57±000.12	024.66±000.11	024.70±000.00	024.51±000.26	024.21±000.14	024.60±000.11
16. <i>Bryconamericus</i> sp.	025.40±000.13	025.80±000.06	025.55±000.13	025.40±000.19	025.21±000.05	025.46±000.30	025.16±000.14	025.09±000.09

1. <i>A. paranae</i> A	9. <i>A. fasciatus</i>	10. <i>A. altiparanae</i>	11. <i>A. ribeirae</i>	12. <i>A. janeiroensis</i>	13. <i>Asyanax</i> sp. D	14. <i>A. parahybae</i>	15. <i>Serrapinus notonelas</i>	16. <i>Bryconamericus</i> sp.
	2.24 Ma	13.82 Ma	18.15 Ma	2.78 Ma	2.88 Ma	17.31 Ma	18.96 Ma	19.54 Ma
2. <i>A. paranae</i> B	2.78 Ma	14.36 Ma	17.84 Ma	3.47 Ma	3.55 Ma	17.47 Ma	19.55 Ma	19.85 Ma
3. <i>A. scabripinnis</i> + <i>A. paranae</i> C	2.06 Ma	14.08 Ma	17.88 Ma	2.82 Ma	2.90 Ma	17.15 Ma	18.90 Ma	19.65 Ma
4. <i>A. bockmanni</i>	2.01 Ma	14.24 Ma	17.62 Ma	2.89 Ma	2.79 Ma	16.82 Ma	18.97 Ma	19.54 Ma
5. <i>A. paranae</i> D	2.15 Ma	13.93 Ma	17.22 Ma	2.65 Ma	2.91 Ma	16.56 Ma	19.00 Ma	19.39 Ma
6. <i>A. paranae</i> E	2.15 Ma	14.08 Ma	17.90 Ma	3.09 Ma	3.35 Ma	16.88 Ma	18.85 Ma	19.58 Ma
7. <i>A. paranae</i> F	0.59 Ma	14.23 Ma	18.01 Ma	2.64 Ma	2.71 Ma	16.95 Ma	18.62 Ma	19.35 Ma
8. <i>A. biotae</i> + <i>A. paranae</i> G	0.40 Ma	14.57 Ma	18.26 Ma	2.92 Ma	3.00 Ma	16.98 Ma	18.92 Ma	19.30 Ma
9. <i>A. fasciatus</i>		14.49 Ma	18.31 Ma	2.83 Ma	2.87 Ma	17.05 Ma	18.92 Ma	19.39 Ma
10. <i>A. altiparanae</i>	018.84±000.22		19.48 Ma	14.18 Ma	14.13 Ma	18.12 Ma	20.72 Ma	21.20 Ma
11. <i>A. ribeirae</i>	023.81±000.11	025.33±000.19		18.29 Ma	18.37 Ma	4.82 Ma	21.27 Ma	20.74 Ma
12. <i>A. janeiroensis</i>	003.68±000.21	018.43±000.20	023.78±000.08		0.44 Ma	17.56 Ma	19.18 Ma	19.30 Ma
13. <i>Asyanax</i> sp. D	003.73±000.14	018.37±000.21	023.88±000.09	000.57±000.05		17.51 Ma	19.23 Ma	19.19 Ma
14. <i>A. parahybae</i>	022.16±000.08	023.56±000.19	006.27±000.08	022.83±000.05	022.77±000.11		20.28 Ma	20.39 Ma
15. <i>Serrapinus notonelas</i>	024.60±000.16	026.94±000.15	027.65±000.08	024.94±000.00	025.00±000.09	026.37±000.00		15.16 Ma
16. <i>Bryconamericus</i> sp.	025.21±000.11	027.56±000.24	026.96±000.09	025.09±000.05	024.95±000.07	026.51±000.05	019.71±000.00	

Tabela 3.: Frequência e localização de haplótipos para as espécies de *Astyanax* estudadas.

HAPLÓTIPOS	NÚMERO	FREQUÊNCIA	BACIA
<i>A. paranae</i> A			
sp1 A	3	10,00%	Tietê
sp1 B	1	3,33%	Tietê
sp1 C	11	36,67%	Tietê/Paranapanema
sp1 D	2	6,67%	Paranapanema
sp1 E	1	3,33%	Tietê
sp1 F	1	3,33%	Tietê
sp1 G	1	3,33%	Grande
sp1 H	1	3,33%	Grande
sp1 I	2	6,67%	Paranapanema
sp1 J	3	10,00%	Paranapanema
sp1 K	2	6,67%	Tietê
sp1 L	2	6,67%	Tietê
<i>A. paranae</i> B			
sp2 A	1	100,00%	Paranapanema
<i>Astyanax bockmanni</i>			
Ab A	2	8,33%	Tietê
Ab B	5	20,83%	Tietê
Ab C	1	4,17%	Tietê
Ab D	1	4,17%	Tietê
Ab E	3	12,50%	Paranapanema
Ab F	3	12,50%	Tietê
Ab G	1	4,17%	Tietê
Ab H	7	29,17%	Tietê/Paranapanema
Ab I	1	4,17%	Paranapanema
<i>A. scabripinnis</i> + <i>A. paranae</i> C			
sp3 A	4	44,44%	Costa Leste
sp3 B	1	11,11%	Costa Leste
sp3 C	1	11,11%	Paranapanema
sp3 D	2	22,22%	Paranapanema
sp3 E	1	11,11%	Paranapanema
<i>A. paranae</i> D			
sp4 A	4	100,00%	Paranaíba
<i>A. paranae</i> E			
sp5 A	5	29,41%	Paranaíba
sp5 B	4	23,53%	Grande
sp5 C	4	23,53%	Paranaíba
sp5 D	1	5,88%	Grande
sp5 E	3	17,65%	Grande
<i>A. paranae</i> F			
Ap A	2	22,22%	Paranapanema
Ap B	1	11,11%	Paranapanema
Ap C	1	11,11%	Paranapanema
Ap D	1	11,11%	Paranapanema
Ap E	1	11,11%	Paranapanema
Ap F	1	11,11%	Paranapanema

Ap G	1	11,11%	Paranapanema
Ap H	1	11,11%	Paranapanema
<i>Astyanax biotae</i>			
Abio A	2	100,00%	Paranapanema
<i>A. paranae G</i>			
sp6 A	1	25,00%	Paranapanema
sp6 B	1	25,00%	Paranaíba
sp6 C	2	50,00%	Paranapanema
<i>Astyanax fasciatus</i>			
Af A	5	21,74%	Paranapanema
Af B	2	8,70%	Tietê
Af C	1	4,35%	Paranapanema
Af D	1	4,35%	Grande
Af E	4	17,39%	Paranapanema
Af F	1	4,35%	Tietê
Af G	1	4,35%	Paranapanema
Af H	2	8,70%	Paranaíba
Af I	1	4,35%	Tietê
Af J	1	4,35%	Grande
Af K	1	4,35%	Grande
Af L	1	4,35%	Grande
Af M	1	4,35%	Paranaíba
Af N	1	4,35%	Grande
<i>Astyanax janeiroensis</i>			
Aj A	2	100,00%	Ribeira
<i>Astyanax sp. D</i>			
spD A	4	66,67%	Iguaçu
spD B	1	16,67%	Iguaçu
spD C	1	16,67%	Iguaçu
<i>Astyanax altiparanae</i>			
Aa A	2	33,33%	Paranapanema
Aa B	1	16,67%	Tietê
Aa C	1	16,67%	Paranaíba
Aa D	1	16,67%	Tietê
Aa E	1	16,67%	Tietê
<i>Astyanax ribeirae</i>			
Ar A	1	11,11%	Ribeira
Ar B	5	55,56%	Ribeira
Ar C	3	33,33%	Ribeira
<i>Astyanax parahybae</i>			
Aph A	1	25,00%	Paraíba do Sul
Aph B	3	75,00%	Paraíba do Sul

Legenda Clados:

- *A. paranae* A
- *A. paranae* B
- *Ascabripensis* + *A. paranae* C
- *A. bockmaria*
- *A. paranae* D
- *A. paranae* E
- *A. paranae* F
- *A. paranae* G + *A. biotae*
- *A. fasciatus*

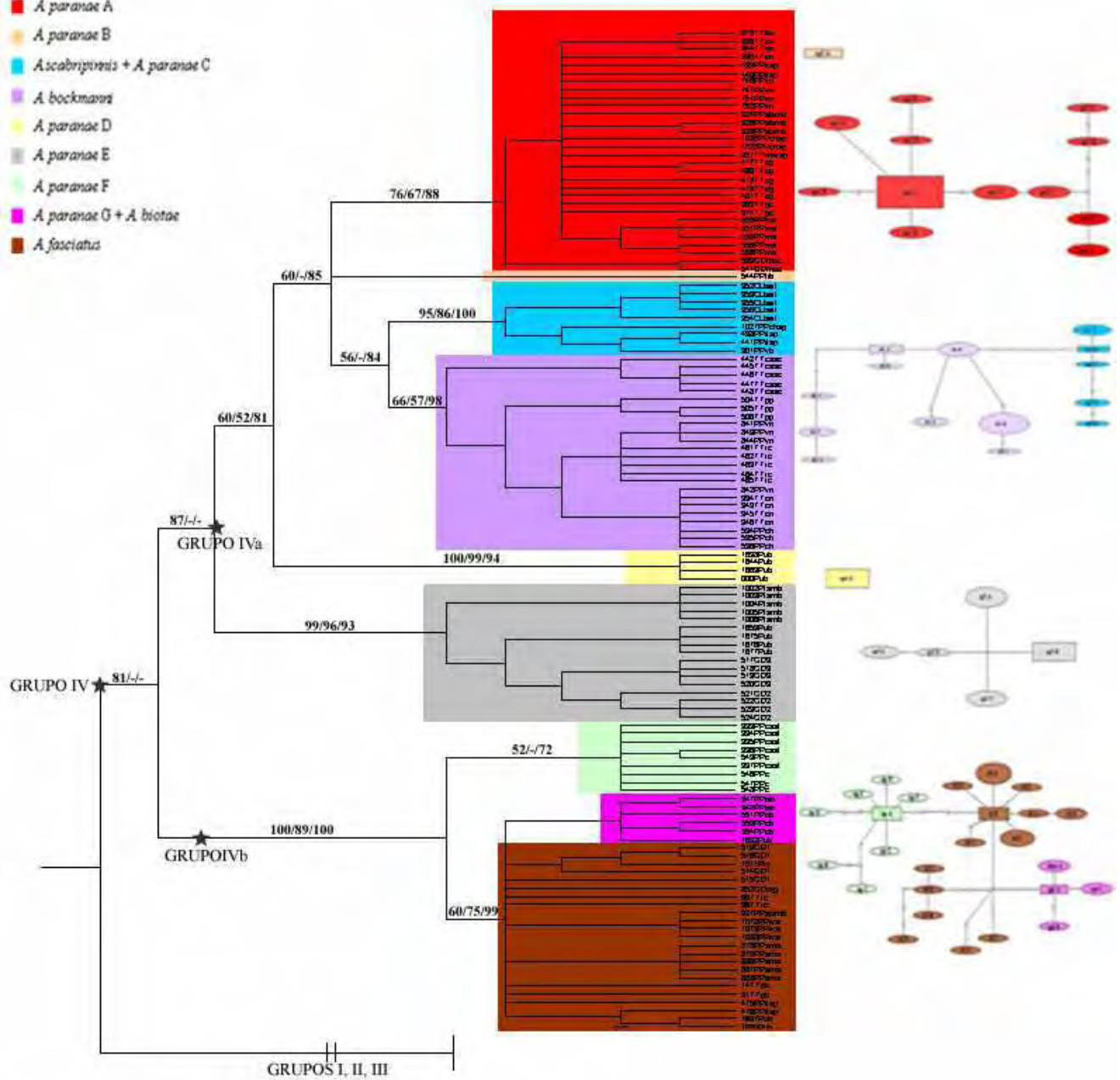


Figura 3.: Fragmento da árvore consenso evidenciando os clados do grupo IV. À direita encontram-se as respectivas redes de haplótipos.

Legenda Clados:

- *A. janae*
- *Astyanax* sp. D
- *A. altiparanae*
- *A. ribeirae*
- *A. paraguayae*

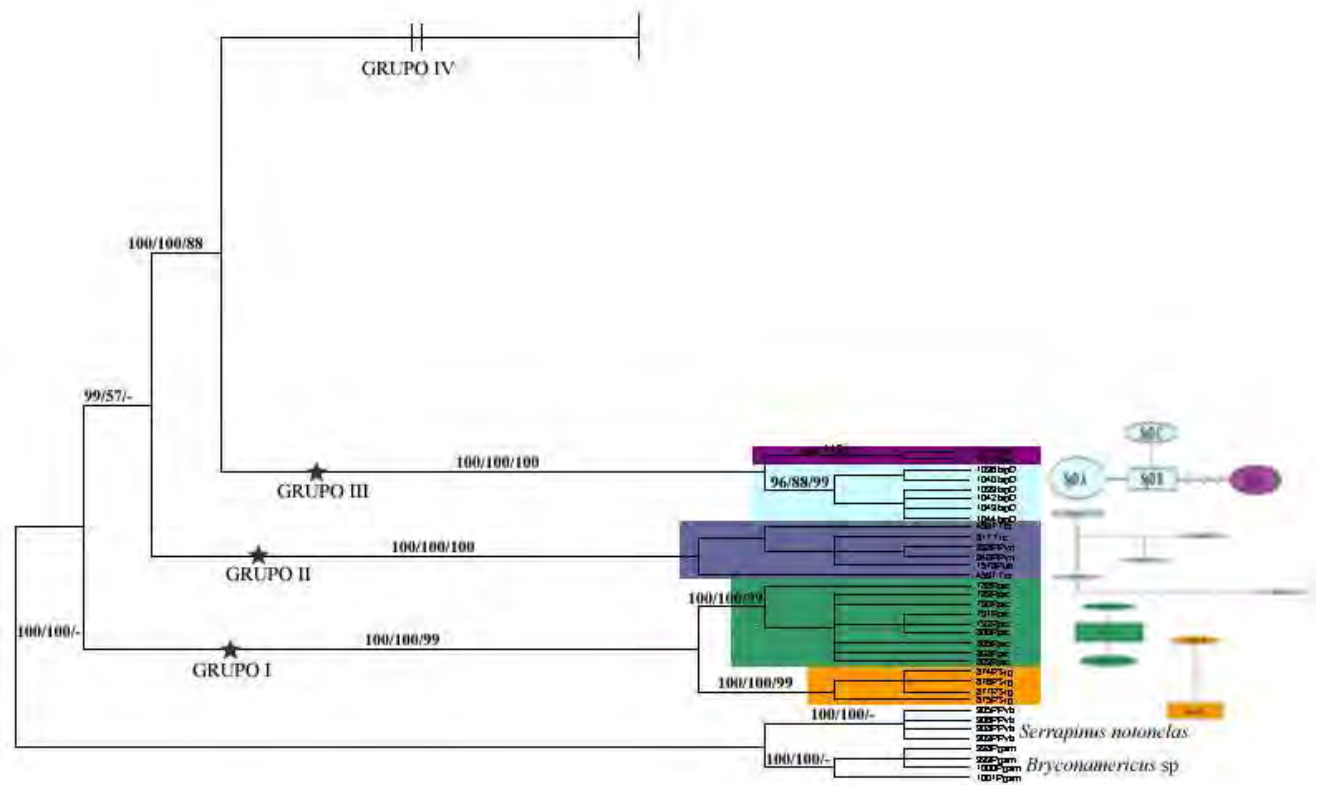


Figura 4.: Fragmento da árvore consenso evidenciando os grupos I, II e III. À direita encontram-se as respectivas redes de haplótipos.

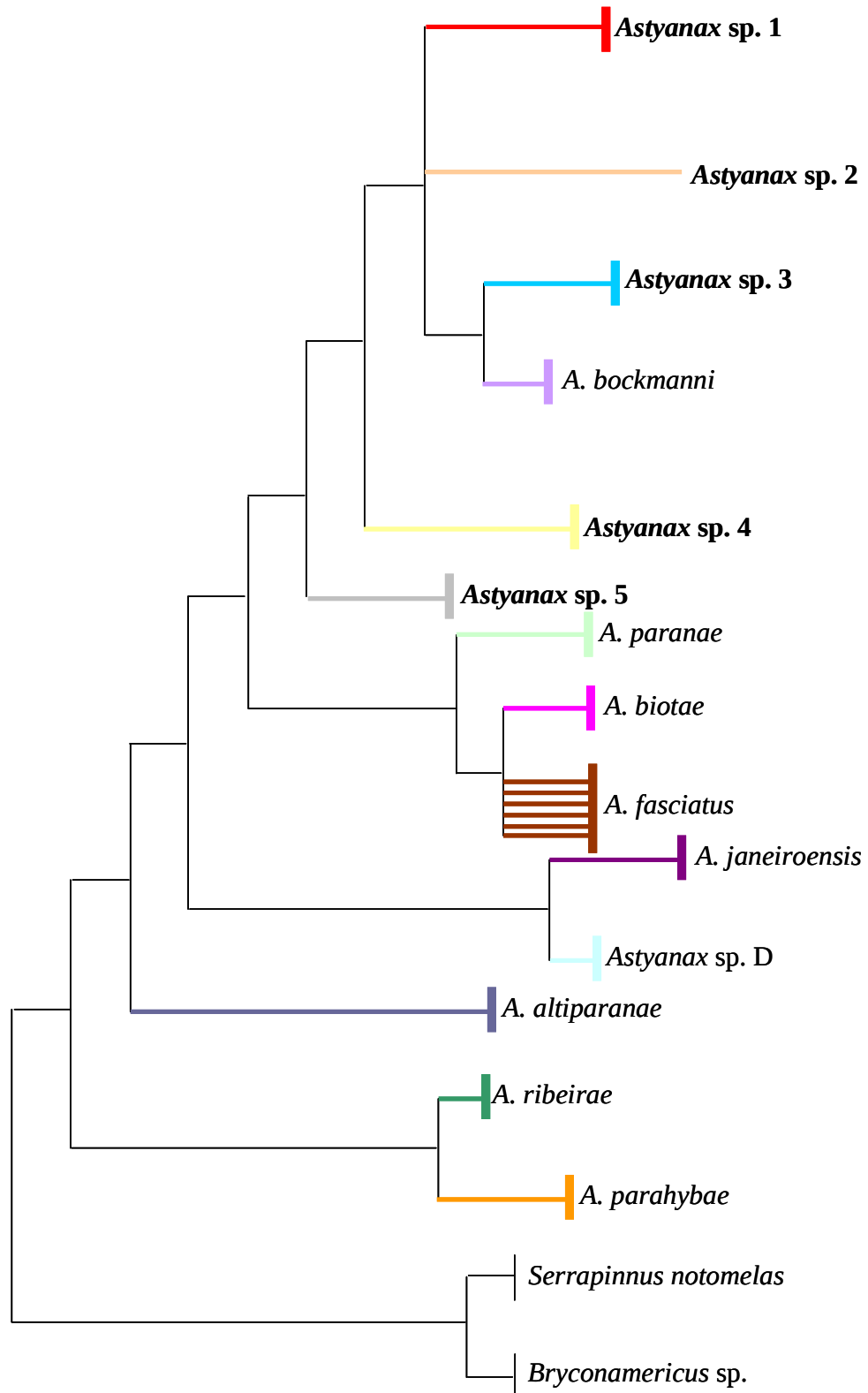


Figura 5.: Árvore resumo evidenciando as novas espécies de *Astyanax* encontradas na bacia do Alto rio Paraná (em negrito). As cores dos ramos correspondem àquelas das análises filogenéticas e filogeográficas, para efeito de comparação.

ANEXO 1

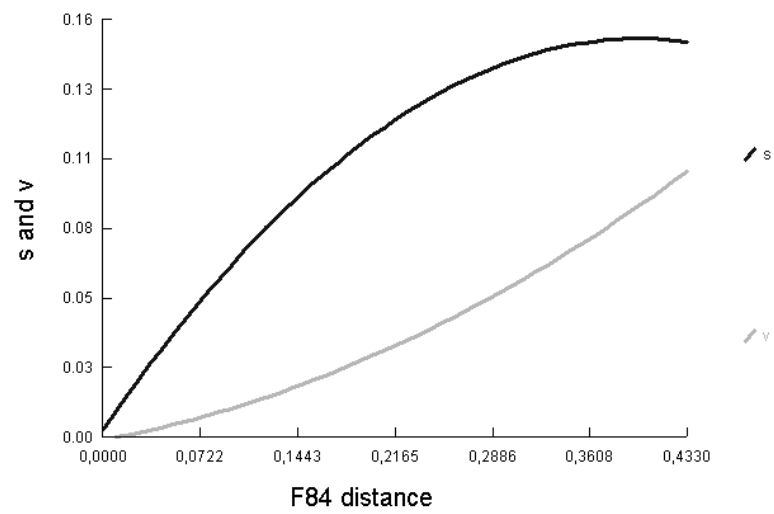


Figura 1.: Gráfico de transição (linha “s”) / transversão (linha “v”), evidenciando a não ocorrência de saturação dos dados.

Tabela 1.: Composição nucleotídica de *Astyanax*

	T(U)	C	A	G	Total		T(U)	C	A	G	Total
918TTbz	29.2	28.3	28.7	13.8	842	547PPe	29.5	28.0	29.2	13.3	842
935TTcn	29.2	28.3	28.7	13.8	842	548PPe	29.7	27.9	29.1	13.3	842
936TTcn	29.3	28.1	28.7	13.8	842	549PPe	29.7	27.7	29.5	13.2	842
944TTcn	29.2	28.3	28.7	13.8	842	947PPbio	29.3	28.0	29.1	13.5	842
439PPitap	29.3	28.1	28.7	13.8	842	948PPbio	29.3	28.0	29.1	13.5	842
440PPitap	29.3	28.1	28.7	13.8	842	551PPcb	29.3	28.0	29.2	13.4	842
746PPvn	29.3	28.1	28.7	13.8	842	553PPcb	29.3	28.1	29.2	13.3	842
747PPvn	29.3	28.1	28.7	13.8	842	554PPcb	29.3	28.1	29.2	13.3	842
751PPvn	29.3	28.1	28.7	13.8	842	1692Pub	29.6	27.8	29.2	13.4	842
752PPvn	29.3	28.1	28.7	13.8	842	513GD1	29.5	27.8	29.1	13.7	842
924PPalamb	29.3	28.1	28.7	13.8	842	514GD1	29.6	27.8	29.1	13.5	842
926PPalamb	29.3	28.1	28.6	13.9	842	515GD1	29.5	28.0	29.1	13.4	842
928PPalamb	29.3	28.1	28.6	13.9	842	516GD1	29.5	27.9	29.1	13.5	842
544PPtib	29.7	27.7	29.1	13.5	842	1011Prv	29.3	28.0	29.1	13.5	842
1026PPchap	29.3	28.1	28.7	13.8	842	852GDemg	29.5	27.9	29.2	13.4	842
1028PPchap	29.3	28.1	28.7	13.8	842	33TTre	29.5	27.9	29.1	13.5	842
957TImarap	29.3	28.1	28.7	13.8	842	36TTre	29.6	27.7	29.3	13.4	842
477TTcg	29.5	28.1	28.7	13.7	842	927PPalamb	29.3	28.0	29.1	13.5	842
478TTcg	29.6	27.9	28.7	13.8	842	878PPama	29.5	27.9	29.2	13.4	842
479TTcg	29.3	28.3	28.7	13.7	842	879PPama	29.5	27.9	29.2	13.4	842
480TTcg	29.5	28.1	28.7	13.7	842	880PPama	29.5	27.9	29.2	13.4	842
481TTcg	29.3	28.3	28.7	13.7	842	881PPama	29.5	27.9	29.2	13.4	842
369TTpc	29.5	28.0	28.7	13.8	842	882PPama	29.5	27.9	29.2	13.4	842
374TTpc	29.6	27.9	28.7	13.8	842	14TTpc	29.5	27.9	29.1	13.5	842
539GDMoc	29.6	27.9	28.7	13.8	842	91TTpc	29.5	27.9	29.0	13.7	842
541GDMoc	29.5	28.1	28.7	13.7	842	475PPitap	29.5	27.9	29.1	13.5	842
555PPma	29.3	28.1	28.7	13.8	842	476PPitap	29.5	27.9	29.0	13.7	842
556PPma	29.3	28.3	28.7	13.7	842	1687Pub	29.5	27.9	29.1	13.5	842
557PPma	29.3	28.1	28.7	13.8	842	1690Pub	29.5	27.9	29.1	13.5	842
558PPma	29.3	28.3	28.7	13.7	842	1078PPivai	29.3	28.0	29.1	13.5	842
559PPma	29.3	28.1	28.7	13.8	842	1079PPivai	29.3	28.0	29.1	13.5	842
952CLbert	29.6	27.9	29.0	13.5	842	1080PPivai	29.3	28.0	29.1	13.5	842
953CLbert	29.6	27.9	29.0	13.5	842	458TTci	30.5	27.0	27.8	14.7	842
954CLbert	29.5	28.0	29.0	13.5	842	459TTci	30.8	26.8	27.8	14.6	842
955CLbert	29.6	27.9	29.0	13.5	842	31TTre	30.5	27.3	27.8	14.4	842
956CLbert	29.6	27.9	29.0	13.5	842	838PPvn	30.5	27.1	28.0	14.4	842
1027PPchap	29.6	27.9	29.0	13.5	842	840PPvn	30.5	27.1	28.0	14.4	842
438PPitap	29.6	27.9	29.1	13.4	842	1578Pub	30.4	27.3	28.0	14.3	842
441PPitap	29.6	27.9	29.1	13.4	842	788Rjac	32.8	26.4	28.4	12.5	842
901PPvb	29.7	27.8	29.0	13.5	842	789Rjac	32.9	26.2	28.4	12.5	842
442TTcasc	29.7	27.9	28.9	13.5	842	790Rjac	32.9	26.2	28.4	12.5	842
445TTcasc	29.8	27.7	28.9	13.7	842	791Rjac	33.0	26.1	28.4	12.5	842
446TTcasc	29.7	27.8	28.9	13.7	842	792Rjac	33.0	26.1	28.4	12.5	842
447TTcasc	29.7	27.8	28.9	13.7	842	805Rjac	32.9	26.2	28.4	12.5	842
448TTcasc	29.7	27.8	28.9	13.7	842	806Rjac	33.0	26.1	28.4	12.5	842
504TTpp	29.7	27.9	28.9	13.5	842	808Rjac	32.9	26.2	28.4	12.5	842
505TTpp	29.7	27.9	29.0	13.4	842	809Rjac	32.9	26.2	28.4	12.5	842
506TTpp	29.7	27.9	29.0	13.4	842	1014Rjan	29.3	28.1	28.7	13.8	842
841PPvn	29.7	27.9	29.0	13.4	842	1017Rjan	29.3	28.1	28.7	13.8	842
842PPvn	29.6	27.9	29.0	13.5	842	1036IspD	29.7	27.8	28.7	13.8	842
843PPvn	29.7	27.9	29.0	13.4	842	1039IspD	29.7	27.8	28.7	13.8	842
844PPvn	29.7	27.9	29.0	13.4	842	1040IspD	29.6	27.9	28.7	13.8	842
461TTre	29.7	27.8	29.0	13.5	842	1042IspD	29.7	27.8	28.7	13.8	842
462TTre	29.7	27.8	29.0	13.5	842	1043IspD	29.7	27.8	28.7	13.8	842
463TTre	29.7	27.8	29.0	13.5	842	1044IspD	29.7	27.8	28.7	13.8	842
464TTre	29.7	27.8	29.0	13.5	842	874P3rg	33.5	25.9	28.3	12.4	842
465TTre	29.7	27.8	29.0	13.5	842	875P3rg	33.5	25.8	28.0	12.7	842
934TTcn	29.6	27.9	29.1	13.4	842	876P3rg	33.5	25.9	28.3	12.4	842
943TTcn	29.6	27.9	29.1	13.4	842	877P3rg	33.5	25.9	28.3	12.4	842
945TTcn	29.6	27.9	29.1	13.4	842	Avg.	29.9	27.7	28.9	13.5	842
946TTcn	29.6	27.9	29.1	13.4	842						
534PPch	29.6	27.9	29.1	13.4	842						
535PPch	29.6	27.9	29.1	13.4	842						
536PPch	29.6	27.9	29.1	13.4	842						
1638Pub	29.2	28.3	29.2	13.3	842						
1644Pub	29.2	28.3	29.2	13.3	842						
1669Pub	29.2	28.3	29.2	13.3	842						
000Pub	29.2	28.3	29.2	13.3	842						
1002Ptamb	29.7	27.8	29.2	13.3	842						
1003Ptamb	29.7	27.8	29.2	13.3	842						
1004Ptamb	29.7	27.8	29.2	13.3	842						
1005Ptamb	29.7	27.8	29.2	13.3	842						
1006Ptamb	29.7	27.8	29.2	13.3	842						
1653Pub	29.8	27.8	29.0	13.4	842						
1675Pub	29.8	27.8	29.0	13.4	842						
1676Pub	29.8	27.8	29.0	13.4	842						
1677Pub	29.8	27.8	29.0	13.4	842						
517GD3	30.2	27.6	28.9	13.4	842						
518GD3	30.2	27.6	28.9	13.4	842						
519GD3	30.2	27.6	28.9	13.4	842						
520GD3	30.2	27.6	28.9	13.4	842						
521GD2	30.3	27.4	28.9	13.4	842						
522GD2	30.3	27.3	28.9	13.5	842						
523GD2	30.3	27.3	28.9	13.5	842						
524GD2	30.3	27.3	28.9	13.5	842						
993PPcast	29.5	28.0	29.2	13.3	842						
994PPcast	29.6	27.9	29.1	13.4	842						
995PPcast	29.6	27.9	29.2	13.3	842						
996PPcast	29.7	27.7	29.6	13.1	842						
997PPcas	29.6	27.9	29.2	13.3	842						
546PPc	29.6	27.9	29.1	13.4	842						

ARTIGO 2 – Identificação molecular de quatro espécies de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) com base em PCR-RFLP.

Maria Eduarda Marreta¹, Allan P. B. Pozzobon¹, Anabel Perdices², Patrícia P. Parise-Maltempi¹, Anderson Luís Alves¹.

¹ *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Laboratório de Genética de Peixes, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av. 24A 1515, Rio Claro, 13506-900, SP, Brasil.*

² *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006, Madrid, Espanha.*

RESUMO

A ampla distribuição do gênero *Astyanax*, desde o México a Argentina, e o grande número de espécies válidas, cerca de 100, aliado a variações morfológicas populacionais que resultam em dificuldades taxonômicas e de relações filogenéticas, tornam o gênero *Astyanax* um clado reconhecidamente polifilético com um número de espécies subestimado. Nesse sentido, o desenvolvimento de chaves taxonômicas conclusivas sobre as espécies do gênero é fundamental, fazendo dos caracteres moleculares um grande aliado nessa busca. Assim, o presente trabalho teve como objetivo distinguir e caracterizar espécies de *Astyanax* da Bacia do Alto rio Paraná, através da análise de PCR-RFLP de DNA mitocondrial. Foram amplificados completamente os genes mitocondriais ATPase 6/8 (850pb) e Citocromo *b* (1100pb) para populações de *Astyanax altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*. As sequências foram submetidas à digestão com as endonucleases *Bam*HI, *Alu*I, *Hind*III, *Hpa*II e *Xba*I com o intuito de se buscar padrões de fragmentos específicos. Depois de excluir o gene ATPase 6/8 e as enzimas *Xba*I e *Hind*III, porque elas não mostraram sítios enzimáticos polimórficos, o gene Citocromo *b* e o uso combinado das enzimas *Bam*HI, *Alu*I e *Hpa*II foram eficientes na identificação das espécies de maior distribuição e abundância na bacia do Alto rio Paraná. Esses resultados sugerem que esse método pode ser uma importante ferramenta, auxiliando a identificação taxonômica das espécies desse gênero tão complexo.

Palavras-chave: *Astyanax*. PCR-RFLP. mtDNA. Taxonomia molecular. Peixe de água doce.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Astyanax*, que é um dos mais representativos da ictiofauna de riachos da região Neotropical, com aproximadamente 143 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2011) caracteriza-se por ser morfológicamente variável sem caracteres derivados ou sinapomorfias que identifiquem o grupo (VARI e CASTRO, 2007). A atual definição de *Astyanax* é baseada em uma combinação de caracteres (duas fileiras de dentes com múltiplas cúspides na pré-maxila com a linha interna do pré-maxilar possuindo cinco dentes, linha lateral completa e nadadeira caudal sem escamas), proposto por Eigenmann (1917). No entanto, muitas dessas características são compartilhadas por outros gêneros de caracídeos (BERTACO e LUCENA, 2006; VARI e CASTRO, 2007). O número de espécies de *Astyanax* é subestimado, resultado da falta de evidências morfológicas para corroborar seu *status* monofilético, sendo frequente encontrar complexos de espécies (HALUCH e ABILHOA, 2005; MELO e BUCKUP, 2006; BERTACO e GARUTTI, 2007; ORNELAS-GARCIA et al., 2008; PIE et al., 2009).

Apesar de sua grande complexidade taxonômica, uma das maiores da ictiofauna Neotropical, ainda há pouca informação acerca da diversidade genética, estrutura populacional e relações evolutivas entre espécies de *Astyanax*. Assim, estudos moleculares podem ser importantes ferramentas para uma correta identificação taxonômica em nível de espécie, na qual há pouca variação morfológica diagnóstica (PEREZ e GARCIA-VASQUEZ, 2004; LIN e HWANG, 2007; MAZUMDER e ALAM, 2009; REA et al., 2009). No gênero *Astyanax*, os estudos evolutivos realizados na América Central e do Norte são baseados em análises de sequências de fragmentos do gene Citocromo *b* (*Cit-b*) (STRECKER et al., 2004) e nas sequências completas dos genes *Cit-b*, 16S rRNA, COI e RAG-1 (ORNELAS-GARCIA et al., 2008). No entanto, alguns autores apresentam diferentes hipóteses taxonômicas; Strecker e colaboradores (2004) sugeriram que *Astyanax mexicanus* seria sinônimo de *Astyanax fasciatus*, enquanto Ornelas-Garcia e colaboradores (2008) sugerem que *A. fasciatus* e *A. mexicanus* possuem uma distribuição restrita na América do Norte e Central e identificam quatro grupos com muitas espécies novas ou não válidas. PCR-RFLP da região mitocondrial de controle identificou a ocorrência de variabilidade intraespecífica em espécies de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná: *A. altiparanae*, *A. cf. fasciatus*, *A. scabripinnis paranae*, *A. shubarti* e da bacia do rio São Francisco: *A. lacustris* (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO,

2002). No entanto, o padrão de restrição encontrado não foi suficiente para identificar taxonomicamente as espécies desse gênero.

A parte superior do rio Paraná representa uma área de endemismo ictiológico e abrange a região correspondente à porção sudeste do escudo cristalino brasileiro (CASTRO et al., 2005). De acordo com Lima e colaboradores (2003), na bacia do Alto rio Paraná ocorrem sete espécies de *Astyanax*: *Astyanax altiparanae*, *A. biotae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus*, *A. paranae*, *A. schubarti*, *A. trierythropterus*. O número real de espécies de *Astyanax* é subestimado nessa bacia e novas espécies puderam ser identificadas em associação com os três complexos de espécies presentes nessa área: “*A. scabripinnis*”, “*A. fasciatus*” e “*A. bimaculatus*” (BERTACO e LUCENA, 2006).

Considerando que estudos sistemáticos anteriores em peixes de água doce mostraram a utilidade da utilização dos genes mitocondriais *Cit-b* e ATP sintetase 6/8 (ATPase 6/8) para propósitos filogenéticos e taxonômicos (SIVASUNDAR et al., 2001; PERDICES et al., 2002; ORNELAS-GARCIA et al., 2008), evidenciando que o DNA mitocondrial pode ser utilizado como uma ferramenta na identificação de espécies crípticas, no presente estudo testamos a eficácia dos métodos de DNA para identificar e caracterizar as quatro espécies de *Astyanax* mais abundantes (*A. altiparanae*, *A. bockmanni* e *A. paranae*, e *A. cf. fasciatus*) que ocorrem na bacia do Alto rio Paraná através da análise de PCR-RFLP dos genes mitocondriais *Cit-b* e ATPase 6/8.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Foram coletados 20 exemplares de quatro espécies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*) em quatro localidades na bacia do Alto rio Paraná (Figura 1, Tabela 1). Os espécimes foram morfológicamente identificados e depositados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP, Rio Claro/SP, com os seguintes números de acesso: *A. altiparanae* LGP838-840, 452-453; *A. bockmanni* LGP746-750; *A. cf. fasciatus* LGP851-854, 856; *A. paranae* LGP484, 485, 489, 495, 499.

2.2. MÉTODOS

O DNA genômico total foi extraído de amostras de músculo e/ou fígado pela técnica do Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (SAMBROOK, 2001). Os genes mitocondriais ATPase 6/8 (850 pb) e Citocromo *b* (1100 pb) foram amplificados via PCR em 13µL de reação: 6.25 µL mix PCR (Qiagen), 5.25 µL água Ultrapura, 0.5 µL de cada *primer* 10 mM (R e F) e 1µL de DNA. Os *primers* usados para o gene ATPase 6/8 foram: *L8331* (5´- AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3´) e *H9236* (5´- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3´) e para o Cit-*b* *GluDG.L* (5´- TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3´) e *H16460* (5´-CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G-3´) (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>). O programa de PCR, para ambos os genes, consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 90 segundos, estendendo a cadeia e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A amplificação dos genes mitocondriais foi verificada em gel de agarose 1.0% corado com 2µL SYBER Safe (10.000X) (Invitrogen), em 1µL tampão de corrida *blue juice* (10X).

O DNA amplificado foi digerido com cinco enzimas de restrição: *Bam*HI, *Alu*I, *Hind*III, *Hpa*II e *Xba*I. A reação de digestão consistiu em: 5µL de produto de PCR, 9µL de água Ultrapura, 1µL de tampão e 1µL de enzima. Essa mistura foi incubada por 12 horas a 37°C em um termociclador. Depois desse processo, inativou-se as enzimas de acordo com as especificações do fabricante (Fermentas). Os fragmentos de PCR-RFLP foram separados em gel de agarose 2% corado com SYBER Safe (Invitrogen).

3. RESULTADOS

O produto de PCR obtido para o gene ATPase 6/8 foi de 850pb e do gene Citocromo *b* foi de 1100pb, não apresentando qualquer variação inter ou intraespécífica. A análise do PCR-RFLP mostrou que, das enzimas utilizadas, descartou-se *Xba*I e *Hpa*II, para ATPase 6/8, e *Xba*I e *Hind*III, para Citocromo *b*, já que as mesmas não apresentaram sítios de restrição distintos para as espécies estudadas, apresentando bandas com o mesmo tamanho dos genes amplificados.

Observou-se que, para o gene ATPase 6/8, as enzimas *Bam*HI, *Hind*III e *Alu*I produziram um padrão espécie-específico de fragmento de restrição de DNA mitocondrial

capaz de separar apenas *A. altiparanae* das demais espécies (Figura 2) e, por isso, foi descartado como uma ferramenta útil na identificação de espécies do gênero *Astyanax*.

Para o gene Citocromo *b* (Figura 3), a enzima *AluI* mostrou ser um potencial marcador para a diferenciação entre *A. altiparanae*, *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*, embora esta enzima gere fragmentos de restrição de tamanhos iguais para *A. bockmanni* e *A. cf. fasciatus*. No entanto, a digestão com as enzimas *HpaII* e *BamHI*, foram eficientes na separação dessas duas espécies, definindo que apenas com a análise combinada de diferentes enzimas de restrição foi possível identificar com padrão espécie-específico cada uma das quatro espécies analisadas.

Polimorfismos intra-específicos foram observados para a população de *Astyanax altiparanae* para as enzimas *AluI* e *HpaII* para o gene Citocromo *b*, com a presença de dois haplótipos mitocondriais em cada enzima nos indivíduos desta espécie (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

Considerando que análises de polimorfismos em sequências de DNA identificadas pelo método de sequenciamento apresentam custos elevados e requerem tempo maior para a realização de experimentos e análises, o método de PCR-RFLP parece ser uma ótima ferramenta para solucionar esses problemas (KIM et al., 2001; CORDES et al., 2001; McDOWELL e GRAVES, 2002), podendo ser aplicado de forma imediata e com baixo custo em diversos estudos nos quais uma identificação rápida e precisa é requerida.

Nossa análise de RFLP com as endonucleases *BamHI*, *AluI*, *HpaII* e *HindIII* dos genes mitocondriais ATPase 6/8 e Citocromo *b* indicou que esse método é bastante eficaz na identificação das quatro espécies de *Astyanax* de maior abundância na bacia do Alto rio Paraná (*A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*). Apesar de ter sido encontrado fragmentos de restrição diagnósticos com as enzimas *BamHI*, *AluI* e *HindIII* apenas para a espécie *A. altiparanae* com o gene ATPase 6/8 (Figura 2), esse gene, embora seja menor do que o Cit-*b*, é bastante útil na identificação de espécies de peixes de água doce (REID e WILSON, 2006), sendo que a utilização de outras enzimas de restrição, provavelmente, possam revelar polimorfismos para os *Astyanax* do Alto Paraná.

Os fragmentos de restrição gerados pelas enzimas *BamHI*, *AluI* e *HpaII* para o gene Cit-*b* foram capazes de identificar corretamente as quatro espécies de *Astyanax* (Figura 3).

Todas as enzimas conseguiram isolar *A. altiparanae* das demais espécies, mas apenas o tratamento combinado com essas enzimas foi capaz de identificar as outras três espécies: *Bam*HI e *Hpa*II geraram fragmentos diagnósticos somente para *A. bockmanni* e a combinação das enzimas *Bam*HI, *Alu*I e *Hpa*II identificaram as espécies *A. cf. fasciatus* e *A. paranae*. A similaridade entre os padrões de fragmento entre *A. paranae*, *A. cf. fasciatus* e *A. bockmanni* sugerem uma maior proximidade filogenética quando comparado com a espécie *A. altiparanae*. Esse fato é reforçado quando observamos a topologia de consenso (Figura 2, Artigo 1), nas quais *A. altiparanae* representa a primeira linhagem divergente da bacia do Alto rio Paraná e também, supostamente, a primeira espécie de *Astyanax* a colonizar essa bacia. As distâncias genéticas entre essas espécies (Tabela 2, Artigo 1), são baixas entre as três primeiras (até 4.0%), porém quando comparadas com *A. altiparanae*, apresentam distâncias superiores a 18.0%.

A observação de polimorfismos intraespecíficos entre as populações de *A. altiparanae* com as enzimas *Alu*I (1000 e 1100pb) e *Hpa*II (900 e 1100pb) para o gene *Cit-b* sugere a presença de dois haplótipos mitocondriais nessa população e pode ser um indicativo de polimorfismo genético. Estudos anteriores utilizando RFLP com outras endonucleases encontraram baixa variabilidade intraespecífica em *A. altiparanae*, *A. cf. fasciatus*, *A. lacustris*, *A. scabripinnis paranae* e *A. shubarti* (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002), mas eles não encontraram padrões diagnósticos para diferentes espécies de *Astyanax*.

Outros estudos utilizando PCR-RFLP foram efetivos na identificação taxonômica de espécies de peixes, como em Ishizaki et al. (2006) que usando o gene 16S rRNA e as endonucleases *Ban*II, *Dde*I e *Nla*III geraram padrões de RFLP capazes de identificar nove espécies de baiacus presentes na região costeira das ilhas Oknawa no Japão.

Além da identificação direta de espécies, a utilização do PCR-RFLP é também uma ótima ferramenta na identificação de diversidade genética entre populações (MAZUMDER e ALAM, 2009) e em estudos forenses (LIN e HWANG, 2007; ROHILLA e TIWARI, 2008).

A busca de marcadores genéticos que podem auxiliar na identificação de espécies de peixes tem aumentado recentemente, particularmente dentro do gênero *Astyanax*. Sabendo que estudos baseados em análises moleculares são ainda escassos (MOYSES e ALMEIDA-TOLEDO, 2002; ORNELAS-GARCIA et al., 2008; PIE et al., 2009), o marcador genético mais utilizado nesse gênero é o cromossômico, o qual mostra grande diversidade no número diplóide, variando de $2n=36$ em *A. schubarti* à $2n=50$ em *A. altiparanae*, seguindo a grande

variação morfológica em *Astyanax* (ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002). Na bacia do Alto rio Paraná é possível encontrar espécies do gênero caracterizadas por grande variação intraespecífica do número diplóide: *A. paranae* ($2n = 46, 48, 50$), *A. cf. fasciatus* ($2n = 46, 48$) e *A. bockmanni* ($2n = 48, 50$), sendo que em *A. paranae*, *A. altiparanae* e *A. cf. fasciatus* observa-se ainda a presença de cromossomos supranumerários e em *A. paranae* a ocorrência de triploídes naturais (OLIVEIRA et al., 2009).

Com base nesta informação, o uso de marcadores cromossômicos para auxiliar na correta identificação taxonômica das espécies de *Astyanax* é dificultado, tornando o desenvolvimento de marcadores moleculares para essas espécies, necessário. Desde a descrição do gênero, as similaridades morfológicas das espécies de *Astyanax* representam um desafio para os taxonomistas, sendo recorrente identificações errôneas, como foi mostrado no Artigo 1, o que acaba dificultando uma correta abordagem acerca da diversidade de espécies do gênero. Somente naquele artigo levantou-se a hipótese de que há pelo menos cinco novas espécies de *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná que haviam sido identificadas como *A. paranae* e que, portanto, essa espécie não forma uma unidade monofilética nessa região.

Assim, o presente trabalho mostrou que as quatro mais abundantes espécies de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná podem ser identificadas com análises de PCR-RFLP, sendo de grande ajuda em estudos taxonômicos e que para aumentar a eficácia desse método, mais populações dessas quatro espécies e outras espécies de *Astyanax* como *A. biotae* e *A. shubarti* devem ser incluídas em análises futuras com o intuito de auxiliar a identificação taxonômica de espécies desse gênero nessa bacia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. L. e MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n=48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.
- BERTACO, V. e LUCENA, CAS. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 53-60, 2006.
- BERTACO, V. e GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 25–30, 2007.

CASTRO M. R., CASATTI L., SANTOS H. F., VARI R. P., MELO A. L. A., et al. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, p. 193-214, 2005.

CORDES, J. F.; ARMKNECHT, S. L.; STARKEY, E.A. e GRAVES, J.H. Forensic identification of sixteen species of Chesapeake Bay sportfishes using mitochondrial Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. **Estuaries**, v. 24, p. 49–58, 2001.

ESCHMEYER, W.N. e FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**, 2011.

Disponível em:

< <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>

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

HALUCH, C. F. e ABILHOA, V. *Astyanax totae*, a new characidae species (Teleostei: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 383–388, 2005.

ISHIZAKI, S.; YOKOYAMA, Y.; OSHIRO, N.; TERUYA, N.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K. e WATABE, S. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 1, p. 139–144, 2006.

KIM, E. J.; YOUNG, J. J.; KANG, S. J.; CHANG, S.Y.; HUH, K. e NAM, D. H. Molecular discrimination of Cervidae antlers and Rangifer antlers. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 114–117, 2001.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; DA SILVA, J.F.P.; VARI, R.P., HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S., MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Family Characidae (Characins, tetras). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.E.; FERRARIS, C.J., Jr. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p. 104–169.

LIN, W. F. e HWANG, D. F. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. **Food Control**, v. 18, p. 1050–1057, 2007.

MAZUMDER, S. K. e ALAM, M. D. S. High levels of genetic variability and differentiation in hilsa shad, *Tenualosa ilisha* (Clupeidae, Clupeiformes) populations revealed by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 190–196, 2009.

MCDOWELL, J. R. e GRAVES, J. E. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. **Fishery Bulletin**, v. 100, p. 537–544, 2002.

MELO, F. A. G. e BUCKUP, P. A. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aenus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 45-52, 2006.

MOYSÉS, C. B. e ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 401-407, 2002.

OLIVEIRA, C., FORESTI, F. e HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 81-100, 2009.

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

PIE et al. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçu River. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2357–2362, 2009.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 25, p. 172-189, 2002.

PEREZ, J. e GARCIA-VAZQUEZ, E. Genetic identification of 9 hake species for detection of commercial fraud. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2792–2796, 2004.

REA, S.; STORANI, G.; MASCARO, N.; STOCCHI, R. e LOSCHI, A. R. Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. **Food Control**, v.1 20, p. 515–520, 2009.

REID, S. M. e WILSON, C. C. PCR-RFLP based diagnostic tests for *Moxostoma* Species in Ontario. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 997–1000, 2006.

ROHILLA, M. S. e TIWARI, P. K. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA and phylogenetic relationships among five species of Indian freshwater turtles. **Journal of Applied Genetics**, v. 49, p. 167–182, 2008.

SAMBROOK, J **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher., 2001.

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, p. 407-417, 2001.

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 Phylogenetic and Evolution**, v. 33, p. 469-481, 2004.

VARI, R. P. e CASTRO, R. M. C. New Species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. **Copeia**, v. 1, p. 150-162, 2007.

Tabela 1. Lista das quatro espécies de *Astyanax* analisadas por PCR-RFLP na bacia do Alto rio Paraná

Espécies	Rio	Bacia	Localidade	Coordenadas
<i>A. altiparanae</i>	Itapetininga	Paranapanema	Itapetininga/SP	23°53'50.12"S 48°15'33.40"W
<i>A. bockmanni</i>	Pardo	Paranapanema	Botucatu/SP	22°56'49.02"S 48°35'13.85"W
<i>A. cf. fasciatus</i>	Mogi-Guaçu	Mogi-Guaçu	Porto Ferreira/SP	21°50'08.01'S 47°30'05.11"W
<i>A. paranae</i>	Canta Galo	Tietê	Rio Claro/SP	22°25'21.67"S 47°47'56.74"W

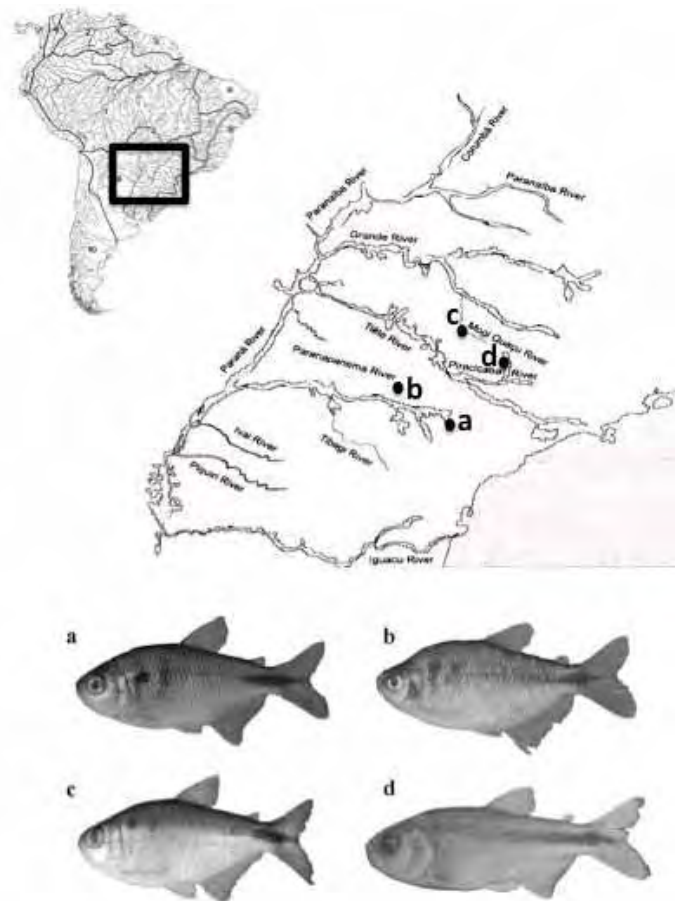


Figura 1. Mapa da área de amostragem das espécies de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná estudadas: a: *A. altiparanae*, b: *A. bockmanni*, c: *A. cf. fasciatus*, d: *A. paranae*.

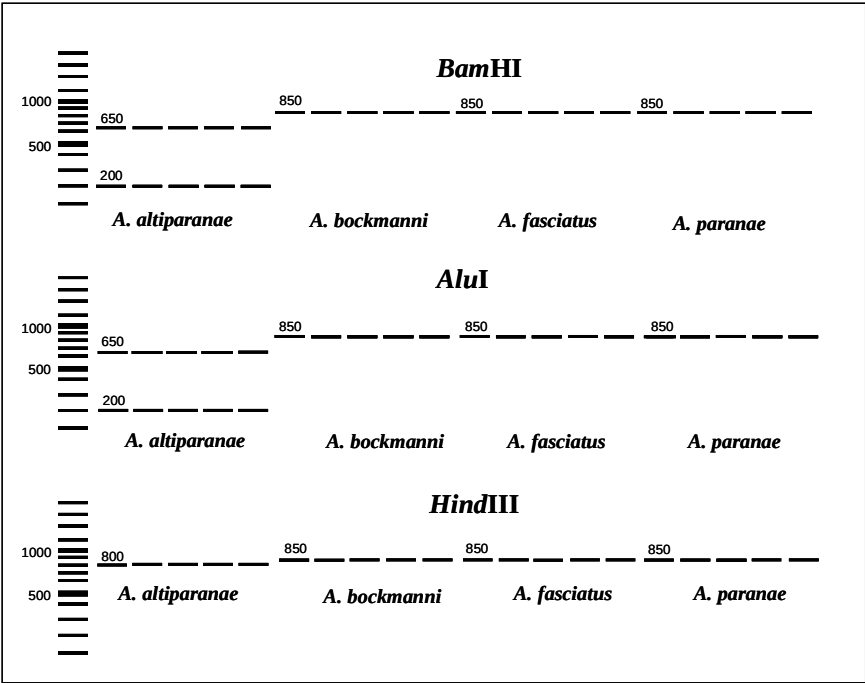


Figura 2.: Fragmentos de restrição gerados pelas enzimas *Bam*HI, *Alu*I e *Hind*III para o gene ATPase

6/8.

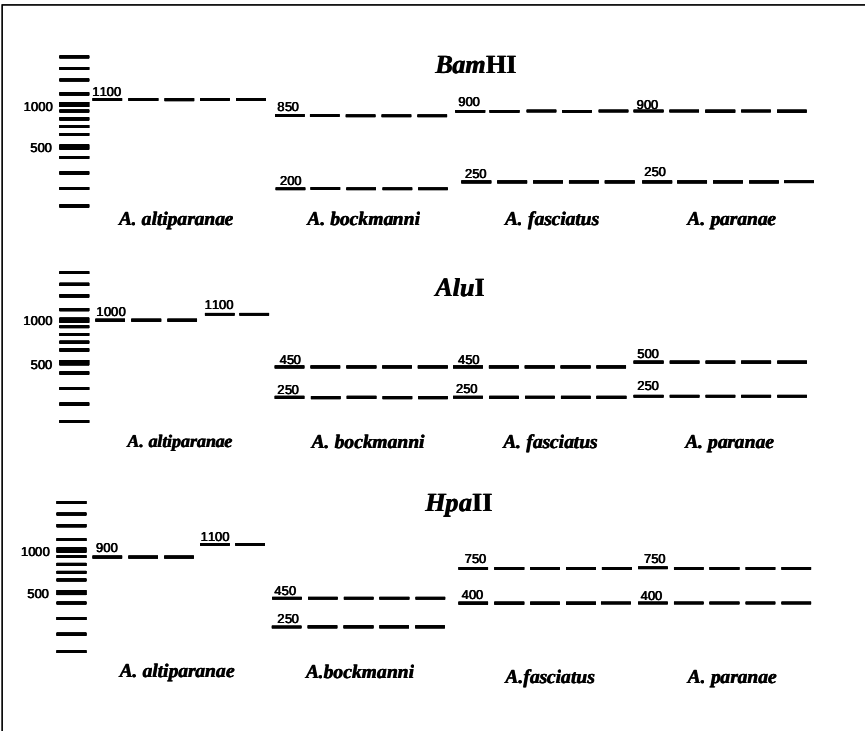


Figura 3.: Fragmentos de restrição gerados pelas enzimas *Bam*HI, *Alu*I e *Hpa*II para o gene Citocromo

b.

5. CONCLUSÕES

A partir das análises filogenéticas e filogeográficas utilizando o gene mitocondrial ATPase 6/8 e os fragmentos de restrição obtidos para o mesmo gene e para o Citocromo *b* para *A. paranae* na bacia do Alto rio Paraná, foi possível concluir que:

- *Astyanax paranae* não forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, sendo encontrada sete linhagens distintas, cujas divergências genéticas são menores do que 4.0%;
- Devem ter ocorrido pelo menos, duas origens distintas para as espécies de *Astyanax* dentro da bacia do Alto rio Paraná; a primeira envolvendo *A. altiparanae* ocorreu a 14.15 Ma, e a segunda envolvendo as demais espécies do gênero, dentre elas, *A. paranae*, a cerca de a 1.8 Ma;
- A dispersão e colonização de *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná deve ter ocorrido a partir da bacia costeira, uma vez que *A. ribeirae* e *A. parahybae* foram os primeiros representantes do gênero a divergir nessa bacia, o que de acordo com o relógio molecular, ocorreu a 17.77 Ma;
- A utilização do gene Citocromo *b* com a análise combinada das endonucleases permitiu identificar as quatro espécies mais abundantes da bacia do Alto rio Paraná: *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus* e *A. altiparanae*;
- Finalmente, nossos resultados são suficientes para recusar a hipótese preliminar, uma vez que *A. paranae* não forma uma unidade monofilética na bacia do Alto rio Paraná, sendo encontrada, provavelmente, cinco novas espécies, anteriormente identificadas como *A. paranae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, N.A. Megageomorfologia do território brasileiro. In: CUNHA, S.B. e GUERRA, A.J.T. (Ed). **Geomorfologia do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertand Brasil, 1998, p. 71-106.
- ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) with 2n=48 chromosomes. **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.
- ALVES, A. L.; PERDICES, A.; REIS, S. F.; OLIVEIRA, C. (submetido 1). Phylogeography and evolutionary history of the Neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae) implications for their taxonomy and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F (submetido 2). Molecular phylogenetic analyses of the Loricariidae family (Teleostei: Siluriformes) inferred from mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**.
- ALVES, A. L. **Análise da evolução da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) baseada em caracteres cromossômicos e de sequências de DNA**. Tese de Doutorado em Genética, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual. Revue of Ecology and Systematics**, v.18, p. 489-522, 1987.
- AVISE JC. Introduction: the scope of conservation genetics. In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. (Ed.). **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York, USA: Chapman & Hall, 1996.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. London: Harvard University Press, 2000.
- BATISTA J. S.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of homing for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n. 4, p. 723-740, 2006.
- BERMINGHAM E.; MCCAFFERTY, S.S.; MARTIN, A.P. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: KOCHER, T.; STEPIEN, C.A. (Ed.). **Molecular Systematics of Fishes**. San Diego, CA: Academic Press, 1997, p. 113-128.
- BERTACO, V.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 1, p. 25-30, 2007.

BERTACO, V.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 53-60, 2006.

BERTACO, V.; MALABARBA, L.R. Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of the Southern Brazil, with comments on the *A. scabripinnis* species complex. **Ichthyology Exploration of Freshwaters**, v. 12, n. 3, p. 221-234, 2001.

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

BRITSKI, H.A.; SATO, Y. e ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco – CODEVASF, 1988.

BRITTO, M. R. e CASTRO, R. M. C. New Corydoradinae Catfish (Siluriformes: Callichthyidae) from Upper Paraná and São Francisco: The Sister Group of *Brochis* and most *Corydoras* species. **Copeia**, v. 4, p. 1006-1015, 2002.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of the Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Malabarba, L.R.; Reis R. E; Vari R. P; Lucena Z.M.S, & Lucena C.A.S. (eds). Edipucrs, Porto Alegre, p.123-144, 1998.

CASATTI, L.; LANGEANI, F. e CASTRO, R.M.C. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná. **Biota Neotropica** v. 1(1,2), 2001. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v1n12/pt/abstract?article+BN00201122001> >

CASTRO, R.M.C. e CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 7, n. 4, p. 337-352, 1997.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed.). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. VI. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

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, R. M. C., et al. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, n. 3, p. 193-214, 2005.

DAGET, J.; GOSSE, J.-P.; THYS VAN DEN AUDENAERDE, D.F.E. **Checklist of the freshwater fishes of Africa**. Paris: ORSTOM, MRAC edition, 1984. Volume I., 410p.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. F.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n.4, p. 379-387, 2002.

DOMINGUES, M.S. Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto do rio Tibagi e alto do rio Iguaçu. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

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, p. 208-310, 1921.

ERLICH, P.R. The loss of diversity: causes and consequences. In: WILSON, E.O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1988.

ESCHMEYER, W.N. e FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**, 2009.

Disponível em:

<<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.html/>>.

ESCHMEYER, W.N. e FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**, 2011.

Disponível em:

<<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>

FAO. **Report of the Eleventh Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture** CGRFA-11/07/15.2, 2007b. <http://www.fao.org/ag/cgrfa/cgrfa11.htm>

FAO/UNEP. Conservation of the genetic resources of fish: problems and recommendations. Report of the Expert Consultation on the genetic resources of fish. **Fishery Technical Paper**, Rome, v. 217, 43 p, 1981.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, A. T.; ARBEX, Y. R.; ALVES, A. L.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. O cariótipo de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes; Characidae) da localidade tipo: implicações na taxonomia. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E

GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002, Maringá/PR. **Anais do IX Simpósio de citogenética e genética de peixes**, Maringá, 2002.

FINK, S.V. e FINK, W.L. Interrelationships of ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FROUPE, E.; ALEKSEYEV, S.; KNIZHIN, I.; WEISS, S. 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, p. 1040-1053, 2005.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 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 Evolution**, v. 37, p. 700–720, 2005.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.F. 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.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S.H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p.498–511, 2010.

LANGEANI, F. **Ictiofauna do Alto Curso do Rio Tietê (SP): Taxonomia**. 231 f. Dissertação de Mestrado- Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1989.

LANGEANI, F.; CASATTI, L.; GAMEIRO, H.S.; BELLUCCO-DO-CARMO, A. e ROSSA-FERES, D.C. Riffle and pool fish communities in a large stream of southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 2, p. 305-311, 2005a.

LANGEANI, F.; LUCENA, Z.M.S.; PEDRINI, J. e TARELHO-PEREIRA, F.J. *Bryconamericus turiuba*, a new species from the upper rio Paraná system (Ostariophysi: Characiformes). **Copeia** v. 2005, n. 2, p. 386-392, 2005b.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; DA SILVA, J.F.P.; VARI, R.P., HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S., MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Family Characidae (Characins, tetras). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.E.; FERRARIS, C.J., Jr. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003a, p. 104–105.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; DA SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.E.; FERRARIS, C.J., Jr. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003b, p. 106–169.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. 534 p.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p. 201-206, 1998.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 365-369, 2000.

MALABARBA, L.R. e WEITZMAN, S.H. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, v.16, p. 67–151, 2003.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

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.

MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, p. 1-40, 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.

MONTOYA-BURGOS, J. I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences.

In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, C. A. S.; LUCENA, Z. M. S. (Ed.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, 1998. p. 363–374.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

MOYSES, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction Fragment Length Polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 401-407, 2002.

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

NELSON, J.S. **Fishes of the world**, 4rd edition, Hoboken: Wiley & Sons. Inc., 2006.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 81–100, 2009.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular evolution: A phylogenetic approach**. UK: Blackwell Science, 1998.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 25, p. 172-189, 2002.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 468-478, 2001.

PERDICES, A.; DOARIO, I.; ECONOMIDIS, P. S.; BOHLEN, J.; BĂNĂRESCU, P. Pleistocene effects on the European freshwater fish fauna: double origin of cobitid genus *Sabanejewia* in the Danube basin (Osteichthyes: Cobitidae). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 26, p. 289-299, 2003.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E. L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* paranae in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 377-380, 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**. London: Chapman and Hall editors, 1993.

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

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n.3, p. 225-246, 2006.

RIBEIRO, A.C.; LIMA, F.C.T.; RICCOMINI, C. e MENEZES, N.A. Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: tetimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 17, n. 2, p.157-164, 2006.

SAMBROOK, J **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher., 2001.

SERRA, J.P., CARVALHO, F.R. & LANGEANI, F. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioiga, São Paulo: composition and biogeography. **Biota Neotropical**, v. 7, n. 1, 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+BN01707012007>>

SHIBATTA, O.A.; OHARA, W.M. Morphological variation in populations of *Tetragonopterus argenteus* Cuvier, 1817 (Characiformes, Characidae) from Madeira and Paraguay river basins. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, n.1, p. 3-8, 2007.

SILFVERGRIP, A. M. C. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). **Swedish Museum of Natural History**, Stockholm, 1996.

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, p. 407-417, 2001.

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 Phylogenetic and Evolution**, v. 33, p. 469-481, 2004.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**4.0Beta,2002.Disponível em: <<http://www.sinauer.com/detail.php?id=8060>>.

TAVARES, D.O. *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) do Sistema do Alto rio Paraná: taxonomia. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, v. 117, p. 343-351, 1987.

TEMPLETON A. R. Using haplotypes trees for phylogeographic and species inferences in fish populations. **Environmental Biology of Fishes**, v. 69, p. 7-20, 2004.

TRAVASSOS, H. e SANTOS, R. S. **Caracídeos fósseis da bacia do Paraíba**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, D. F. e divisão de Geologia e Mineralogia do Departamento Nacional de produção Mineral, R. J., D. F., 1955.

VARI, R.P. e MALABARBA, L.R. Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP et al (Ed) **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998, p. 1-12.

XIA, X. e XIE. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.

ZARDOYA, R.; DOADRIO, I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 227–237, 1999.

ZENATTI, P. P. 2006. **Análise Filogeográfica de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) da região de Campos do Jordão (SP)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 86p.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Genetic Conservation of Brazilian Fishes - Present State and Perspectives. **Annual Review Biomedical Sciences**, v.6, p. 79-90, 2004

WEITZMAN, S. H. e MALABARBA, L. R. Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from eastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.10, n. 1, p. 1-43, 1999.

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

WILSON, E.O. The current state of biological diversity. In: WILSON, E.O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1988.