
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)**

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E HISTÓRIA EVOLUTIVA DO
GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM BASE EM
CARACTERES MOLECULARES.**

ALLAN PIERRE BONETTI POZZOBON

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

2012

ALLAN PIERRE BONETTI POZZOBON

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E HISTÓRIA EVOLUTIVA DO GÊNERO *Astyanax*
(TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM BASE EM CARACTERES MOLECULARES.**

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

Orientador: Anderson Luis Alves

Co-orientadora: Patrícia P. Parise-Maltempi

RIO CLARO

- 2012 -

597
P894r Pozzobon, Allan Pierre Bonetti
 Relações filogenéticas e história evolutiva do gênero
Astyanax (TELEOSTEI: CHARACIDAE), com base em
caracteres moleculares. / Allan Pierre Bonetti Pozzobon. - Rio
Claro : [s.n.], 2012
 52 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Anderson Luis Alves
 Co-Orientador: Patricia Pasquali Parise-Maltempi

 1. Peixe. 2. DNA Mitochondrial. 3. Filogeografia. 4.
Região neotropical. I. Título.

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

RESUMO

O gênero *Astyanax* é um dos maiores, mais complexo e bem distribuído entre os gêneros de peixes de água doce da região Neotropical. Sua amplitude ocorrendo desde o sul da América do Norte até a região central da Argentina, faz com que ele se encontre em uma grande quantidade de ambientes diferenciados impossibilitando, muitas vezes, o fluxo genético, isolando populações e espécies. Dados morfológicos, citogenéticos e moleculares estão sendo levantados, entretanto a taxonomia do gênero continua confusa e incerta, reforçando a necessidade de um amplo estudo de sistemática molecular. Nesse sentido caracterizamos parte das espécies de *Astyanax* existentes para estabelecer as relações filogenéticas entre os grupos, utilizando os genes mitocondriais Citocromo B (CitB) e ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8), completamente seqüenciados apresentando 1090bp e 846pb respectivamente. Foram analisados 57 indivíduos pertencentes a 30 espécies de *Astyanax*, sendo oito provenientes da América Central e 22 da América do Sul, mais 7 indivíduos de 5 gêneros utilizados como grupo externo, para os genes ATPase 6/8. Obteve-se um número menor de indivíduos para o gene CitB, 47 pertencentes a 25 espécies de *Astyanax*, mais 6 gêneros próximos representados cada por 1 indivíduo. Utilizamos os métodos de Parcimônia, Distancia, Verossimilhança e Análise Bayesiana para inferir as relações filogenéticas entre as espécies. Encontramos uma profunda diferenciação entre as da América Central e do Sul, assim como das espécies costeiras com as demais, sendo que essas são basais para todo o grupo. O alto valor de divergência das seqüências das espécies costeiras com as demais (acima de 30%) é similar a encontrada entre diferentes gêneros de Characidae, utilizando a taxa de evolução de 1,3%/ma para os genes ATPase6/8 e 0,8% para CitB, chega-se a uma datação em torno de 25 ma para separação entre as espécies costeiras das demais. Nesse período ocorria uma regressão marinha o que pode ter proporcionado uma união entre os rios Paraíba do Sul e Ribeira de Iguape, explicando o agrupamento das duas espécies, atualmente cada uma em um extremo do estado de São Paulo. O valor encontrado entre as espécies da América Central contra o restante das espécies da América do Sul está acima de 20%, esse valor indica um evento de separação desses grupos por volta de 18 ma, nessa época ocorria um intercâmbio de faunas entre os rios do Alto Paraná e o Oeste Amazônico. As altas divergências observadas entre as seqüências dos dois genes indicam eventos vicariantes muito antigos, com sucessivas colonizações e especiações, propomos ocorrer uma primeira diferenciação das espécies costeiras que ficaram isoladas devido as transgressões marinhas que alagaram parte da Argentina e sul do Brasil, em um segundo evento de diversificação, espécies da região amazônica colonizaram a região do alto Paraná e anteriormente a elevação do Istmo do Panamá a América Central; ocorrendo ainda uma recolonização mais recente das bacias Paraguai-Paraná pelo grupo *A. bimaculatus* na mesma época da colonização da América Central.

ABSTRACT.

The genus *Astyanax* is one of the largest and well distributed among the freshwater fishes from the Neotropical region. It's found since south of North America until the central region of Argentina, being founded in a lot of different environments, many times, which difficulties in maintaining the gene flux, isolating populations and species. Morphological, cytogenetically and molecular data has been arise, but the taxonomy of the genus is still confuse and uncertain, reinforcing the necessity of a broad molecular systematic study. As so, we characterized part of the existent species of *Astyanax* with the proposal of establish the phylogenetic relationship among the groups; we utilize the mitochondrial genes Cytocromo B (CitB) and ATP synthetase 6 and 8 (ATPase6/8), completely sequenced presenting 1090 pb and 846 pb respectively. Has been analyzed 57 individuals belonging to 30 *Astyanax* species, being eight from Central America and 22 from South America; plus seven individuals from five genera utilized as out-groups, this for the ATPase6/8 genes. We have a small number of individuals for the CitB gene, 47 individuals belonging to 25 *Astyanax* species, plus six close genera, each one witch one individual. The methods of Parcimony, Distance, Likelihood and Baysiaen analyses have been conducted to infer the phylogenetic relationship among the species. We found a significant differentiation between Central and South America species, as so between costal species and the others, being those one's basils for the all group. The high divergence found between sequences of costal species and the others (above 30%) is close to the one's founded among different genus of Characidae, utilizing the mutation rate of 1,3%/ma for the ATPase6/8 and 0,8%/ma for CitB, we reach a value around 25 ma for the separation of costal species of the others; in this period a marine regression is taking place in the globe, what could created conditions for the union between the coastal rivers of Paraiba do Sul and Ribeira de Iguape, explaining the grouping of the typical species of those rivers, today apart, each one is in one extreme of São Paulo state. The value founded between the Central America species and the others species of South America is above 20%, indicating a separation of this group around 18 ma, at this time a faunistic exchange is taking place between the High Paraná river and the west Amazon basin. The high divergence founded between the sequences of the two genes indicates ancients vicariants events, which successive colonization's and speciation's, we propose that the first differentiation that happens was of the costal species, that has been isolated because of marine transgressions that flooded part of Argentina and Brasil; in a second event of differentiation, amazonic species colonized the region of the High Paraná and later, after the rise of Panama Isthmus, the Central America; happing a second colonization, more recent, of the Paraguai-Paraná basins by the *A. bimaculatus* group at the same time of the colonization of Central America.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	06
1.1. Conservação genética: Variabilidade molecular e Sistemática.....	06
1.2. Sobre a ictiofauna neotropical.....	07
1.3 Sobre o gênero <i>Astyanax</i>	09
1.4 Aspectos genéticos do gênero <i>Astyanax</i>	11
1.5 Justificativa.....	13
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Materiais.....	13
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA.....	18
3.2.2. Análises Filogenéticas e Relógio Molecular	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Composição nucleotídica das seqüências dos genes ATPase6/8 e CitB.....	20
4.2. Análises filogenéticas e relógio molecular.....	20
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO.

1.1. Conservação genética: Variabilidade molecular e Sistemática.

Conservação genética é uma ciência aplicada, envolvendo o uso de genética molecular e da genética evolutiva, na conservação da biodiversidade. Áreas como a caracterização genética de espécies cativas ameaçadas, buscando uma variabilidade que não leve a depressão gênica e a perda da capacidade de reprodução, da mesma forma em populações desconectadas em ambientes selvagens, são importantes campos de atuação onde a genética pode trabalhar para a conservação (Frankham, 2010).

Outra possibilidade é o monitoramento da variabilidade genética em espécies invasoras e híbridas, apontando indícios da direção dessas espécies em relação aos seus crescimentos populacionais e reprodução. No entanto a maioria dos trabalhos focam no sentido da caracterização da biodiversidade, sendo que cada vez mais as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para gerar informações em grupos de difícil taxonomia.

A classificação da diversidade é fundamental para conservação (Margules & Pressey, 2000), apenas com o conhecimento da abrangência de espécies com que se esta lidando, pode-se adotar medidas corretas de conservação e manejo. A nível taxonômico de espécies, a classificação é de suma importância para a definição de unidades representativas da biodiversidade, como sistemas de reservas de água doce, que visem a proteção da totalidade de variedades de espécies (Linke et al., 2007).

Recentemente, análise molecular filogenética tem revelado diversidades crípticas em um vasto campo de espécies incluindo algas (Wright et al., 2000), esponjas (Miller et al., 2001), crustáceos (Goetze, 2003; King and Hanner, 1998; Kitaura et al., 2002), cnidários (Dawson and Jacobs, 2001; Dawson et al., 2005; Holland et al., 2004), moluscos (Collin, 2000; Kirkendale and Meyer, 2004), briozoários (Hoare et al., 2001), ascídeas (Tarjuelo et al., 2001), macro invertebrados de água doce (Liu et al., 2003; Baker et al., 2004; Wellborn and othran, 2007) e peixes (Colborn et al., 2001; Miya and Nishida, 1997; Waters and Wallis, 2000; Martin and Bermingham, 2000). Essas espécies crípticas, muito similares morfológicamente, impossibilitam sua distinção baseada em caracteres morfológicos apenas. Assim o emprego de análises moleculares vem se constituindo numa importante ferramenta taxonômica, auxiliando na identificação de táxons e na determinação da área de distribuição das espécies, reduzindo assim, a subestimativa da biodiversidade.

1.2. Sobre a ictiofauna Neotropical.

Reis et. al. (2003), em ampla revisão, reconhecem 71 famílias e 4475 espécies pertencentes aos chamados peixes Neotropicais de água doce, embora no mesmo estudo os autores postulam que um numero muito maior de espécies deva existir, cerca de 6000. De acordo com Schaefer (1998), esse numero pode ser ainda maior, chegando a 8000 espécies de peixes de água doce habitando a região Neotropical, aproximadamente 25% das espécies de todos os peixes do mundo. Esse numero esta em concordância com as estimativas de Vari e Malabarba (1998) que calculam que toda essa diversidade de espécies ocupa apenas 0,003% das águas do mundo.

Dentro de toda essa variabilidade, destaca –se, nos peixes ósseos (Teleostei), a superordem Ostariophysii composta por 5 ordens (Gonorynchiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes, e Gymnotiformes), responsável por aproximadamente 68% de todos os peixes de água doce (Nelson, 2006).

Somente entre os Characiformes, quase 2000 espécies são reconhecidas em bacias das Américas e África. Na ultima década mais de 300 espécies foram descritas para a ordem, a maior parte na região neotropical, cuja diversidade de habitats levou a incontáveis adaptações; os characiformes apresentam desde espécies com tamanho muito pequeno, passando por espécies de tamanho médio até espécies de tamanho gigante, apresentando diversos papéis tanto ecológicos, como no fluxo energético dentro do ecossistema, na ciclagem de material, quanto econômicos na pesca e consumo de comunidades tradicionais (Oliveira e Hilsdorf, 2009)

Trabalhos enfocando as relações entre as famílias dos characiformes tem abordagens nos campos da morfologia (Uj, 1990; Lucena, 1993; Buckup, 1998) e da genética (Orti e Meyer, 1997; Calcagnotto et. al., 2005), havendo congruências e incongruências entre os trabalhos.

A família Characidae é a maior entre os characiformes, sendo ainda considerada a quarta família mais diversa entre os peixes (Mirande, 2009), ela esta presente em regiões que abrangem desde a região sul do Texas, na América do norte, passando por toda a América Central, ocupando a América do Sul até a região norte da Patagônia, apresentando mais de 1100 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2009). As espécies apresentam uma ampla diversidade de tamanhos e formas de corpo, assim como de nichos ecológicos ocupados, sendo de relevância econômica tanto na comercialização e consumo de pescados, quanto na

aqüicultura onde uma série de pequenas espécies, conhecidas como “tetras” são muito populares.

A história taxonômica da família chega aos trabalhos de Linnaeus (1758), sendo que espécies reconhecidas hoje como characidae, *Astyanax bimaculatus* e *Charax gibbosus*, estão presentes em seu legado. A série de trabalhos de Eigenmann (1912, 1915, 1917, 1918, 1921, 1927) e Eigenmann e Myers (1929), ajudaram na delimitação da família Characidae, sendo que a maior parte dos gêneros foram definidos com a combinação alternada de 17 caracteres. Não houve contestação desses trabalhos clássicos de sistemática até Rosen (1972) e Weitzman e Fink (1983), apontarem a importância de uma classificação que reflita a filogenia da família.

Posteriormente, diversos trabalhos enfocando a filogenia de alguns gêneros e subfamílias dos characidae foram apresentados (Machado-Allison, 1983; Weitzman and Fink, 1985; Reis, 1989; Malabarba, 1998; Weitzman and Menezes, 1998), porém poucos tentaram abranger a maior parte das espécies da família, sendo destacados os trabalhos de Malabarba e Weitzman (2003), Mirande (2009, 2010) com abordagens morfológicas; com abordagens moleculares destacam-se os trabalhos de Javonillo et. al. (2010) e Oliveira et. al. (2011).

Lima et. al. (2003) consideram como subfamílias válidas de Characidae apenas aquelas que apresentam monofilia, deixando 88 gêneros classificados como *incertae sedis*. Com a descrição de novos gêneros locados nessa categoria, o número na mesma chega a 92 dos 170 gêneros presentes na família (Mirande, 2009), entre eles *Astyanax*, alvo do presente trabalho.

Castro et. al. (2003, 2005) chamam a atenção para os estudos de sistemática, evolução e ecologia das espécies de peixes de pequeno porte, sendo esses os grandes desafios da ictiologia Neotropical do século 21. Ainda é pequeno o número de trabalhos utilizando dados moleculares para interpretar a história filogenética dos peixes Neotropicais, porém indicam que a taxonomia dos peixes de água doce desta região, muitas vezes distorce nossa visão de relacionamentos ao nível de espécie (Perdices et al., 2002).

Os peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15cm de comprimento, correspondem a 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). Estas espécies são dependentes da vegetação ripária para a alimentação, abrigo e reprodução, por isso estão ameaçadas por atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e pesticidas associados a atividades agrícolas intensivas (Castro et al., 2003; Castro et al., 2005).

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. Onde foram identificadas novas espécies (6 para a bacia do Tietê, 8 para a bacia do Paranapanema e 4 para a bacia do rio Grande) além de várias espécies com *status* taxonômico indeterminado, principalmente no gênero *Astyanax* (Castro et al., 2003; Castro et al., 2004; Castro et al., 2005).

1.3 Sobre o gênero *Astyanax*.

O gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 abriga atualmente cerca de 100 espécies (Garutti & Britski, 2000, Lima et al., 2003). A última revisão completa do gênero, feita por Eigenmann há cerca de 70 anos (1912 e 1927), considerava 74 espécies e subespécies; nos anos que se seguiram espécies foram retiradas do gênero e várias outras foram descritas. No trabalho mais recente sobre o gênero, Géry (1977) arranhou as espécies dentro de um esquema que segue fundamentalmente aquele proposto por Eigenmann (1927) e reconhece pouco mais de 60 espécies, aparentemente desconsiderando algumas e referindo-se a outras como subespécies.

Sua ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitat em rios e riachos, faz com que este seja um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Embora alto, o número de espécies de *Astyanax* ainda é subestimado, entre os anos de 2003 e 2011 foram descritas 30 novas espécies no gênero, principalmente pertencentes ao complexo *scabripinnis*. A sistemática do gênero é confusa e ainda não está resolvida devido à falta de evidências para corroborar seu status monofilético (Weitzman e Malabarba, 1998; Melo e Buckup, 2006; Bertaco e Garutti, 2007).

A definição atual de *Astyanax*, baseada na combinação de caracteres propostos por Eigenmann (1917), torna a identificação de espécies trabalhosas, pois, muitos dos caracteres diagnósticos são compartilhados com outros gêneros de Characídeos (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 e muitas vezes complexos de espécies são encontrados, sendo três deles amplamente reconhecidos:

1) “complexo *Astyanax bimaculatus*”, composto aproximadamente por 18 espécies e subespécies, caracterizado pela presença de mácula umeral negra horizontalmente ovalada,

duas barras verticais escuras situadas na região umeral e mácula negra no pedúnculo caudal estendida até os raios caudais medianos.

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

3) “complexo *Astyanax scabripinnis*” composto de 15 espécies compartilhando número reduzido de raios ramificados da nadadeira anal, altura do corpo reduzida, cabeça e corpo robustos (Garutti & Britski, 2000; Bertaco & Lucena, 2006; Melo & Buckup, 2006). Eigenmann (1921) ao descrever *Astyanax scabripinnis* reconheceu diferenças morfológicas populacionais e as atribuiu erroneamente como subespécies e não como espécies distintas estritamente relacionadas. Os primeiros autores a reconhecer *Astyanax scabripinnis* como um complexo de espécies foram Moreira-Filho e Bertollo (1991), com base em caracteres morfológicos e cariotípicos diagnosticando ao menos seis populações dos rios da bacia do São Francisco e alto rio Paraná. A discussão sobre o complexo *scabripinnis* foi expandida por Bertaco e Malabarba (2001) com a descrição de duas novas espécies relacionadas ao complexo de espécies. Deste então, a atual tendência é de considerar as subespécies de *Astyanax scabripinnis* como espécies válidas (Bertaco e Malabarba, 2001; Lima et al., 2003; Bertaco e Lucena, 2006).

As espécies que compõem o complexo *Astyanax scabripinnis* estão distribuídas ao longo das bacias adjacentes do rio 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: *Astyanax 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 *Astyanax scabripinnis* sejam reconhecidas como espécies válidas um profundo estudo taxonômico e sistemático neste complexo ainda é necessário, para assim, se estabelecerem às relações filogenéticas entre as espécies válidas e identificar novas espécies pertencentes ao complexo *A. scabripinnis*.

Trabalhos envolvendo a taxonomia e sistemática do gênero são diversos, descrições de novas espécies são freqüentes, assim como trabalhos citogenéticos e moleculares relacionando populações e espécies, onde destacamos os trabalhos de abordagem morfológica de Tavares (2007), onde foram reconhecidas nove espécies existentes no sistema do Alto rio Paraná, sendo duas novas a serem descritas, seis são redescritas, e uma é retirada do gênero. Nesta hipótese a bacia do Alto rio Paraná compreende as seguintes espécies de *Astyanax*: *A. altiparanae*, *A. biotae*, *A. bockmanni*, *A. cf. fasciatus*, *A. paranae*, *A. schubarti*, *A. trierythropterus*, *Astyanax sp.1* (Localidade tipo: Restrita a riachos do rio Paranaíba, principalmente nos tributários da margem direita, Goiás) e *Astyanax sp.2* (localidade tipo: Riachos do rio Paranaíba, nos tributários de ambas as margens, Goiás). A espécie *A. paranahybae* apresentou características morfológicas relacionadas ao gênero *Piabina* sendo sugerida sua inclusão neste gênero. Tavares (2007), ainda propõem neste trabalho uma chave taxonômica para o gênero *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná, sendo a única disponível para esta bacia.

Outro importante trabalho morfológico de revisão e descrição de espécies de *Astyanax* foi apresentado por Garavello e Sampaio (2010), onde são descritas cinco novas espécies da bacia do rio Iguaçu, já reconhecidas previamente (*A. sp. G*= *A. longirhinus*, *A. sp. C*= *A. minor*, *A. sp. B*= *A. bifasciatus*, *A. sp. D*= *A. serratus*, *A. sp. E*= *A. dissimilis*), porém, sem descrição oficial; *A. gymnogenis* é redescrita com a inclusão de *A. sp. A* na espécie.

1.4 Aspectos genéticos do gênero *Astyanax*.

A complexidade envolvida na genética desse gênero é quase tão grande quanto a sua dispersão, embora exista um bom número de trabalhos levantando dados citogenéticos sobre o mesmo, eles ainda são insuficientes dada sua dispersão que vai desde do sul dos Estados Unidos, onde foram encontrados exemplos de *A. mexicanus* apresentando $2N=50$ (Oliveira et.al., 2007), até a Argentina, onde foram encontrados exemplos de *A. bimaculatus* apresentando $2N=50$ (Oliveira et.al., 2007). No Brasil o número de trabalhos é grande,

principalmente no complexo *A. scabripinis*, onde se encontram espécies de *A. bimaculatus*, apresentando $2N=50$, provenientes da bacia do Traíri no Rio Grande do Norte (Fernandes e Martins-Santos, 2004), até Três Bocas no Paraná onde espécies de *A. fasciatus* apresentam $2N=46$ (Oliveira et al., 2007). Na bacia do Alto Paraná as principais espécies, *A. altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. schubarti*, apresentam $2N= 50$, $2N=50$ e $2N=36$ respectivamente. Ainda são encontrados os prováveis complexos de espécies como *A. fasciatus* que apresentam citótipos que variam de $2N= 46$ em sua maioria, até $2N=48$ em algumas poucas populações. A espécie *A. paranae* única representante do complexo *A. scabripinis* na bacia do Alto Paraná, também apresenta indícios de ser um pequeno complexo de espécies. Os números diplóides mais frequentes em *Astyanax paranae* são $2n=50$ e $2n=48$ cromossomos, entretanto algumas populações apresentam $2n=46$ (Maistro et. al., 1998; Alves e Martins-Santos, 2002; Porto-Foresti et al., 1997).

No ramo da genética molecular alguns trabalhos utilizam genes mitocôndrias e nucleares. Ornelas-García et.al. (2008) propuseram um modelo de dispersão filogeográfica para o gênero *Astyanax* na América Central e sul da América do Norte, com bases no gene mitocondrial Citocromo B e no gene nuclear *RAG1*. Em outro trabalho na região sul da América do norte e América Central Strecker et al. (2004) , utilizando parte do gene Citocromo B, propuseram um modelo filogeográfico de dispersão para os *Astyanax* de caverna, bem como novas propostas taxonômicas para o gênero.

Na bacia do Alto Paraná, o trabalho de Moysés e Almeida-Toledo (2002) utilizaram a técnica de RFLP para identificar padrões nas espécies de *A.altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. lacustris*, *A. scabripinnis paranae* e *A. schubarti*.

Pie et al. (2009) utilizaram a região mitocondrial D-loop para resgatar as relações filogenéticas entre espécies do gênero *Astyanax* do alto rio Iguaçu, encontrando suporte apenas no clado formado por *A. altiparanae*, porém, mesmo esse com dois grupos de haplótipos bem divergentes; as outras espécies, ainda não descritas até então (*A. sp. B*, *A. sp. C*, *A. sp. D*, *A. sp. E*) e *A. sp. 1*, não tiveram sua monofilia comprovada, sendo que, indivíduos de espécies diferentes eram agrupados, juntamente entre elas, com altos valores de suporte.

Melo (2009) em seu trabalho de mestrado, utilizou um fragmento do gene mitocondrial Citocromo B, visando relacionar as espécies (na época ainda não descritas) de *Astyanax* que habitam o rio Iguaçu (*A. sp. B*, *A. sp. C*, *A. sp. D*, *A. sp. E*, *A. sp. F*) com espécies das bacias adjacentes do Alto Paraná (*A. bockmanni*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *A.*

aff. paranae) e Paraguai (*A. abramis* e *A. asuncionensis*), mais seqüências de *A. fasciatus* e *A. mexicanus* da América Central obtidas no Genbank.

1.5. Justificativa.

A ampla distribuição do gênero, a complexidade taxonômica e o baixo poder de dispersão de muitas delas, devido ao tamanho, faz com que o grupo seja um ótimo candidato para se estabelecer padrões evolutivos e biogeográficos gerais, assim justificamos o presente trabalho como uma importante contribuição, não só na área de evolução, como também da taxonomia, já que o grupo apresenta ainda muitas incertezas.

2. OBJETIVOS.

- Estabelecer as relações filogenéticas entre as principais espécies do gênero *Astyanax*.
- Determinar a diversidade genética entre as espécies analisadas, no intuito de auxiliar inferências no campo da sistemática e taxonomia.
- Estimar, por meio da análise de relógio molecular, os padrões evolutivos de origem e dispersão do gênero *Astyanax* nas Américas.

3. MATERIAS E MÉTODOS.

3.1. Materiais.

Um total de 64 indivíduos, 37 espécies, tiveram seus genes ATPase 6/8 seqüenciados, sendo 57 indivíduos pertencentes ao gênero *Astyanax*, 3 ao gênero *Bryconamericus*, 1 *Serrapinus notomelas*, 1 *Cyphocharax magdalena*, 1 *Hyphessobrycon reticulatus* e 1 *Ctenobrycon alleni*, utilizados como grupos externos. Dentro de *Astyanax* foram amostradas 30 espécies, sendo 8 provenientes da América Central (*A. mexicanus*, *A. petenensis*, *A. hubbsi*, *A. aenus*, *A. orthodus*, *A. nicaraguensis*, *A. belizanus*, *A. nasutus*) e 22 da América do Sul (*A. parahybae*, *A. ribeirae*, *A. magdalena*, *A. schubarti*, *A. rivularis*, *A. lineatus*, *A. pirapuan*, *A. serratus*, *A. janeiroensis*, *A. rutilus*, *A. eigenmanniorun*, *A. fasciatus*, *A. biotae*, *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. scabripinnis*, *A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. altiparanae*, *A. bimaculatus*, *A. sp2*, *A. sp3*), das bacias do rio Paraná-Paraguai, São Francisco, Ribeira de Iguape, Paraíba do Sul e Magdalena (Tabela 1).

Tabela 1: Nome e número das espécies, com localidades e números do Genbank, para os genes ATPase6/8.

/	Espécies	Nº LGP	Localidade	Nº Genbank
	<i>A. biotae</i>	950/951	- Rio Paranapanema, Cambe/PR.	
	<i>A. eigenmanniorum</i>	958/959	- Rio Guaíba, Barra do Ribeiro/RS.	
	<i>A. magdalena</i>	962	- Rio Apon, Machiques de Perija-Zulia/Venezuela.	
	<i>A. pirapuan</i>	966	-Rio Aricá Mirim, Chapada dos Guimarães/MT.	
	<i>A. lineatus</i>	970	-Rio Caxipo-Açu, Chapada dos Guimarães/MT.	
	<i>A. rivularis</i>	976 978	-Rio Cipó, Santana do Riacho/MG. - Rio das Velhas, Brumadinho/MG.	
	<i>A. asuncionensis</i>	984/985	-Rio Cuiabá, Cuiabá/MT.	
	<i>A. scabripinnis</i>	952/956	-Costa Leste, Bertioga/SP.	
	<i>A. bockmanni</i>	934/946	-Rio Tietê, Bauru/SP.	
	<i>A. sp2</i>	1644/1699	-Rio Paranaíba, Uberlândia/MG.	
	<i>A. sp3</i>	1006 1676	-Rio Paranaíba, Capitólio/MG. -Rio Paranaíba, Uberlândia/MG.	
	<i>A. paranae</i>	995/996	-Rio Tibagi, Castro/PR.	
	<i>A. fasciatus</i>	513 1690	-Rio Muzambinho, Muzambinho/MG. -Rio Uberlândia, Uberlândia/MG.	
	<i>A. altiparanae</i>	458/459	-Córrego Invernada, Penápolis/SP.	
	<i>A. riberae</i>	788/789	-Rio Jacupiranguinha, Jacupiranga/SP.	
	<i>A. janeiroensis</i>	1014/1017	-Rio Turvo, Cerro Azul/PR.	
	<i>A. serratus</i>	1036/1039	-Rio Iguaçu, Paraná.	
	<i>A. parahybae</i>	875/876	-Rio Paraíba do Sul, Pindamonhangaba/SP.	

	<i>A. rutilus</i>	1561	-Rio da Prata, Punta Lara/ Argentina.	
	<i>A. schubarti</i>	1564/1567	-Rio Piracicaba, Santa Maria da Serra/SP.	
	<i>A. abramis</i>	986	-Rio Coxipo-Açu, Chapada dos Guimarães/MT.	
	<i>A. bimaculatus</i>	STRI353/ STRI412	-Argentina	
	<i>A. mexicanus</i>	1105/G75Asmex/ g76AASmex	-Rio Cariño de La Montaña/ México.	
	<i>A. petenensis</i>	STRI7719/ STRI7720	-Lago Peten-Itza/ Guatemala.	
	<i>A. hubbsi</i>	STRI8187/ STRI8291	-Rio Peñon Blanco/ México.	
	<i>A. aeneus</i>	STRI8898/ STRI8940/ STRI14608/ STRI14609	-Rio Tamazula/ México.	
	<i>A. orthodos</i>	STRI1296/ STRI2015	-Rio Sixaola/ Costa Rica.	
	<i>A. nicaraguensis</i>	STRI3198/ STRI3076	-Rio Malacatoya/ Nicarágua.	
	<i>A. belizanus</i>	STRI4840/ STRI4910	-Rio Morazan/ Guatemala.	
	<i>A. nasutus</i>	STRI3774/ STRI1718	-Rio Atoya/ Nicarágua.	
	<i>C. alleni</i>		-Rio Paraguai, Caceres/MT.	
	<i>H. reticulatus</i>		-Rio Jacupiranguinha, Jacupiranga/SP.	
	<i>B. emperador</i>	-		AF412618.1
	<i>B.scopiferus</i>	-		AF412626.1
	<i>Bryconamericus</i> sp	999	-Rio Paranaíba, Corumbaiba/GO.	
	<i>C.magdalena</i>	-		AF412941.1
	<i>S. notomelas</i>	909	-Rio Itapetininga, São Miguel Arcanjo/SP.	
Total	37	64		

Um numero menor de indivíduos teve o gene CitB sequenciado 53 indivíduos em um total de 31 espécies, sendo 29 pertencentes ao gênero *Astyanax*, 1 *Serrapinus notomelas*, 1 *Ctenobrycon alleni*; 1 indivíduo de *Exodon paradoxus*, *Mimagoniates lateralis*, *Hemibrycon Beni* e *Bryconamericus diaphanus* tiveram sua seqüências obtidas do Genbank. Dentro de *Astyanax* foram analisadas 25 espécies sendo 10 provenientes da América Central

(*A. mexicanus*, *A. petenensis*, *A. hubbsi*, *A. aenus*, *A. orthodus*, *A. nicaraguensis*, *A. belizanus*, *A. nasutus*, *A. armandoi*, *A. altior*) que tiveram suas sequencias obtidas no Genbank. Outras 15 da América do Sul (*A. riberae*, *A. magdalena*, *A. schubarti*, *A. rivularis*, *A. rutilus*, *A. eigenmanniorun*, *A. fasciatus*, *A. biotae*, *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. scabripinnis*, *A. assuncionensis*, *A. altiparanae*, *A. bimaculatus*, *A. sp2*), provenientes das bacias do rio Paraná-Paraguai, São Francisco, Ribeira de Iguape e Magdalena (Tabela 2).

Tabela 2: Nome e número das espécies, com localidades e números do Genbank, para o gene CitB.

/	Espécies	Nº LGP	Localidade	Nº Genbank
	<i>A. biotae</i>	552/947	- Rio Paranapanema, Cambe/PR.	
	<i>A. eigenmanniorum</i>	958/959 1109	-Rio Guaíba, Barra do Ribeiro/RS.	
	<i>A. magdalena</i>	962 965	- Rio Apon, Machiques de Perija-Zulia/Venezuela. - Rio Santa Rosa, Machiques de Perija-Zulia/Venezuela.	
	<i>A. rivularis</i>	976	-Rio Cipó, Santana do Riacho/MG.	
	<i>A. asuncionensis</i>	983/984	-Rio Cuiabá, Cuiabá/MT.	
	<i>A. scabripinnis</i>	952/953	-Costa Leste, Bertioga/SP.	
	<i>A. bockmanni</i>	749/750	Véu da Noiva, Botucatu/SP.	
	<i>A. sp2</i>	1644/Sn ⁰	-Rio Paranaíba, Uberlândia/MG.	
	<i>A. paranae</i>	995/996	-Rio Tibagi, Castro/PR.	
	<i>A. fasciatus</i>	914/915	-Rio São Francisco/MG.	
	<i>A. altiparanae</i>	530/531	-Córrego Invernada, Penápolis/SP.	
	<i>A. riberae</i>	788/807	-Rio Jacupiranguinha, Jacupiranga/SP.	

	<i>A. rutilus</i>	1561	- Rio da Prata, Punta Lara/ Argentina.	
	<i>A. schubarti</i>	1564	Rio Piracicaba, Santa Maria da Serra/SP.	
	<i>A. bimaculatus</i>	-	Argentina	FJ439334 FJ439347
	<i>A. mexicanus</i>	-	-Rio Cuatro Cienegas/México. -Rio Cariño de la Montaña/México.	FJ439216 FJ439208
	<i>A. petenensis</i>	-	-Lago Peten-Itza/ Guatemala.	FJ439315 FJ439316
	<i>A. hubbsi</i>	-	-Rio Peñon Blanco/México. -Rio San Juan/México.	FJ439210 FJ439213
	<i>A. aeneus</i>	-	-Parque Urupuan/ México. -Rio Tamazula/ México.	FJ439215 FJ439224
	<i>A. orthodos</i>	-	-Rio Sixaola/ Costa Rica.	FJ439357
	<i>A. nicaraguensis</i>	-	-Rio Chile/ Nicarágua. -Rio Malacatoya/ Nicarágua.	FJ439280 FJ439296
	<i>A. belizanus</i>	-	-Rio Morazan/ Guatemala. -Rio San Pedro/ Belize.	FJ439335 FJ439319
	<i>A. nasutus</i>	-	-Rio La Chepa/ Nicarágua. -Rio Atoya/Nicarágua.	FJ439304 FJ439307
	<i>C. alleni</i>		-Rio Paraguai, Caceres/MT.	
	<i>B. diaphanus</i>	-		AY791375.1
	<i>H. beni</i>	-		AY791402.1
	<i>E. paradoxus</i>	-		AY791397.1
	<i>M. lateralis</i>	-		AY791420.1
	<i>S. notomelas</i>	909	-Rio Itapetininga, São Miguel Arcanjo/SP.	
Total	31	53		

3.2. Métodos.

3.2.1. Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA.

O DNA total foi obtido a partir de amostras de sangue, fígado ou músculo, utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (Sambrook, 2001). As amostras foram preservadas em tampão de eluição ou água deionizada autoclavada; a amplificação efetuada em um ciclador térmico (EPPENDORF™). Os genes mitocondriais CitB e ATPase 6/8 incluindo seqüências conservados de tRNA (RNA transportadores) que flanqueiam este complexo de genes, foram amplificados. Utilizamos os *primers* L8331 (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3'), obtendo um total de 846 pares de bases, para ATPase 6/8 (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>). O gene CitB foi amplificado utilizando-se os *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') (Kocher et.al., 1989), obtendo um total de 1090 pares de bases.

A reação de amplificação por PCR dos genes ATPase 6/8 e CitB foi obtida a partir de um volume de 25µL de uma solução contendo: 15 µL de água destilada, 2.8 µL dNTP (8mM), 2.5 µL de 10X “PCR Buffer” (Biotools), 1.7 µL de cada *primer* (10µM), 0.3 µL de DNA Polimerase (1 unidade) (Biotools DNA Polymerase) e 1.0 µL de DNA molde (cerca de 200 ng). Para os dois genes o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 40s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 40s para anelamento dos primers, 68°C por 2 min, estendendo a cadeia, uma extensão final de 72°C por 5 min.

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% para confirmação do resultado. Para as análises de seqüências, o DNA amplificado foi purificado pelo tratamento com a enzima EXOSAP (GE Healthcare). O DNA purificado foi seqüenciado com o kit DYEnamic ET terminator reagent premix para MEGABACE (Amersham Biociences), em um seqüenciador automático de DNA modelo MEGABACE 1000 (GE HealthCare™), através de terceirização de serviços pela empresa MacroGen da Korea.

3.2.2. Análises Filogenéticas e Relógio Molecular.

O nível de saturação dos dados, para o acúmulo de transição e transversão, foi checado no programa DAMBE: *Data analysis in molecular biology and evolution* (Xia e Xie, 2001). Utilizamos o ClustalW, vinculado ao programa DAMBE, para obter o melhor alinhamento, que foi checado, a olho, posteriormente.

As análises filogenéticas pelos métodos de Distância genética (Neighbour-Joining) e Verossimilhança (VS), foram conduzidas utilizando os parâmetros obtidos pelo Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) no programa PAUP*v. 4.0b10 (Swofford, 2002). Para a análise de Máxima Parcimônia (MP) foram utilizadas as buscas heurísticas de topologias com 10 réplicas de adição de táxons ao acaso. Apenas as topologias com menor número de passos foram retidas e os ramos com comprimentos zero foram colapsados. Diferentes pesos foram empregados para ajustar as saturações transicionais nas análises de MP. Utilizamos o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com pelo menos 1000 réplicas, para gerar suporte estatístico na base dos ramos, sendo colapsados aqueles com valor igual ou inferior a 50%.

A inferência Bayesiana (BI) foi usada para obter medidas adicionais de suporte para ramos obtidos por MP, NJ e VS através do emprego do programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbenck and Ronquist, 2001). Foram utilizados 2 milhões de gerações de quatro cadeias MCMC (Monte Carlo Markov Chains) sob o modelo de evolução escolhido no Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998), com frequência de amostragem de topologias a cada 100 gerações.

Foram conduzidos testes no programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), utilizando as espécies que se repetiam (*A.mexicanus*, *A. petenensis*, *A. hubbsi*, *A. aenus*, *A. orthodus*, *A.nicaraguensis*, *A. belizanus*, *A. nasutus*, *A. biotae*, *A. eigenmanniorum*, *A. magdalena*, *A. rivularis*, *A. asuncionensis*, *A. scabripinnis*, *A. bockmanni*, *A. sp2*, *A. paranae*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae*, *A. ribeirae*, *A. rutilus*, *A. schubarti*, *S. notomelas* e *C. allení*). Assim criamos uma matriz concatenada dos dois genes. Utilizamos os métodos de Neighbor-Joining e Máxima Parcimônia, com teste estatístico de *bootstrap* com 1000 réplicas. Conduzimos, também análises de inferência Bayesiana no programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbenck and Ronquist, 2001) com os mesmos parâmetros citados no parágrafo acima.

A taxa constante de substituição de nucleotídeo para os genes ATPase 6/8 e CitB, foi avaliada usando o teste de χ^2 para a taxa ML log-likelihood para topologias clock-enforced e non-enforced (Page and Holmes, 1998) realizadas no PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 2002). A calibração do relógio molecular para ATPase 6/8 em peixes é de 1.3% de divergência nucleotídica por milhão de ano (Bermingham et al., 1997), já para o gene CitB observa-se a divergência de 0,8% por ma calculada por Ornelas-Garcia et. al. (2008).

4. RESULTADOS.

4.1. Composição nucleotídica das seqüências dos genes ATPase6/8 e CitB.

O alinhamento das seqüências, dos genes ATPase6/8, das espécies de *Astyanax*, apresentou um total de 842 pares de bases, sendo 338 delas conservadas, 454 variáveis, 414 informativas para Paracimônia. As seqüências apresentaram a seguinte composição média de bases: 31,1 (T), 26,8 (C), 28,9 (A) e 13,2 (G) com uma média de 279 códonos utilizados. Essa composição nucleotídica esta de acordo com o conhecido para os genes mitocondriais de vertebrados no qual a quantidade média de guanina é inferior às demais bases nitrogenadas (Kocher et.al., 1989).

As seqüências do gene CitB, apresentaram um total de 1090 pares de base, sendo 614 delas conservadas, 436 variáveis e 379 informativas para Paracimônia. As seqüências apresentaram a seguinte composição média de bases: 31,6 (T), 28,7 (C), 26,2 (A) e 13,6 (G) com uma média de 350 códonos utilizados.

4.2. Análises filogenéticas e relógio molecular.

As taxas de transição e transversão, para os dois genes, foram analisadas no programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) no intuito de checar se não há saturação de dados devido a múltiplas substituições, os resultados estão dentro do esperado, não sendo encontrada saturação dos dados em nenhum dos dois genes (Figuras 1 e 2).

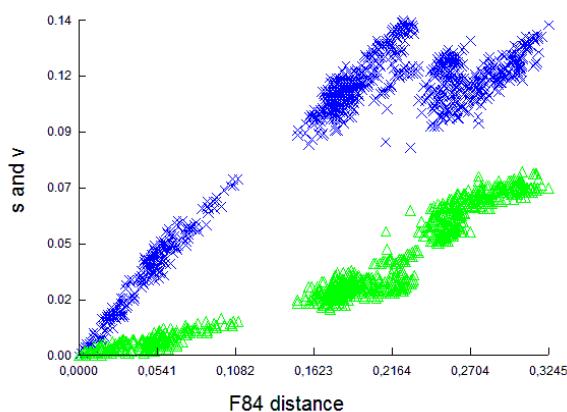


Figura 1: Gráfico indicando os níveis de saturação de Transição e Transversão para CitB.

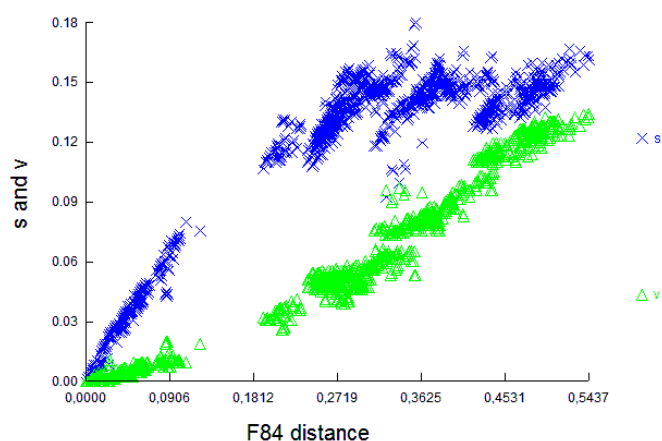


Figura 2: Gráfico indicando os níveis de saturação de Transição e Transversão para Atpase6/8.

Os resultados das diferentes metodologias são congruentes, sendo encontrada uma mesma topologia com variações nos valores de *bootstrap* (NJ, VS, MP) e de probabilidade posterior (BI). As topologias foram analisadas individualmente e um consenso entre os quatro métodos foi gerado com valores de majority rule de 50% (figuras 3 e 4).

NJ- MP- VS- BI

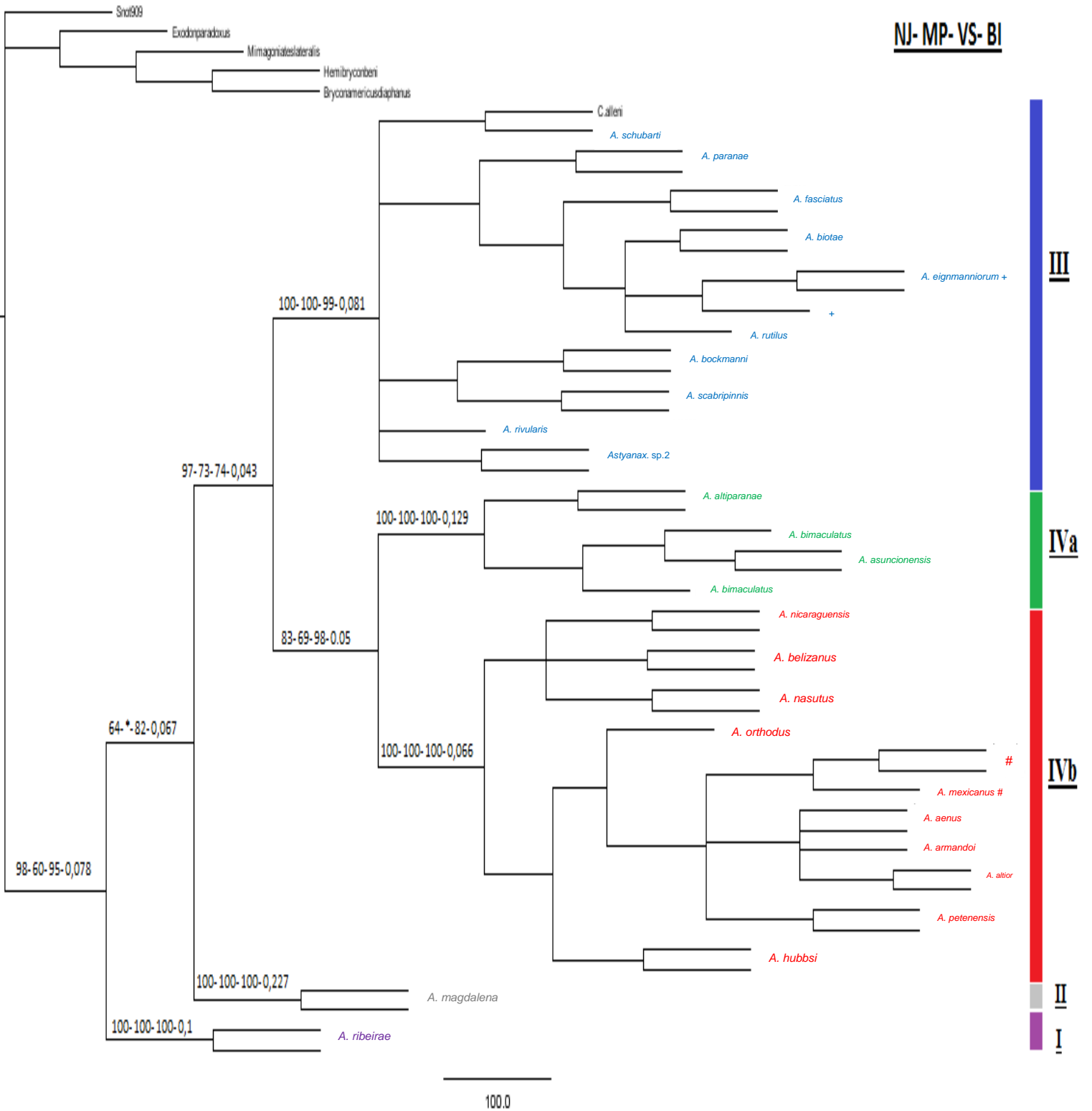


Figura 3: Topologia consenso, para o gene CitB, entre os métodos de Neighbor-joining (NJ), Maxima Pârsimonia (MP), Verossimilhança (VS) e análise Bayesiana (BI). Valores de *bootstrap* e probabilidade *a posteriori* estão nas bases dos ramos seguindo a ordem das metodologias indicadas acima na figura. Sinal de * indica que o ramo não foi recuperado pela metodologia. Barras coloridas delimitam a posição e tamanho dos clados, enumerados a margem.

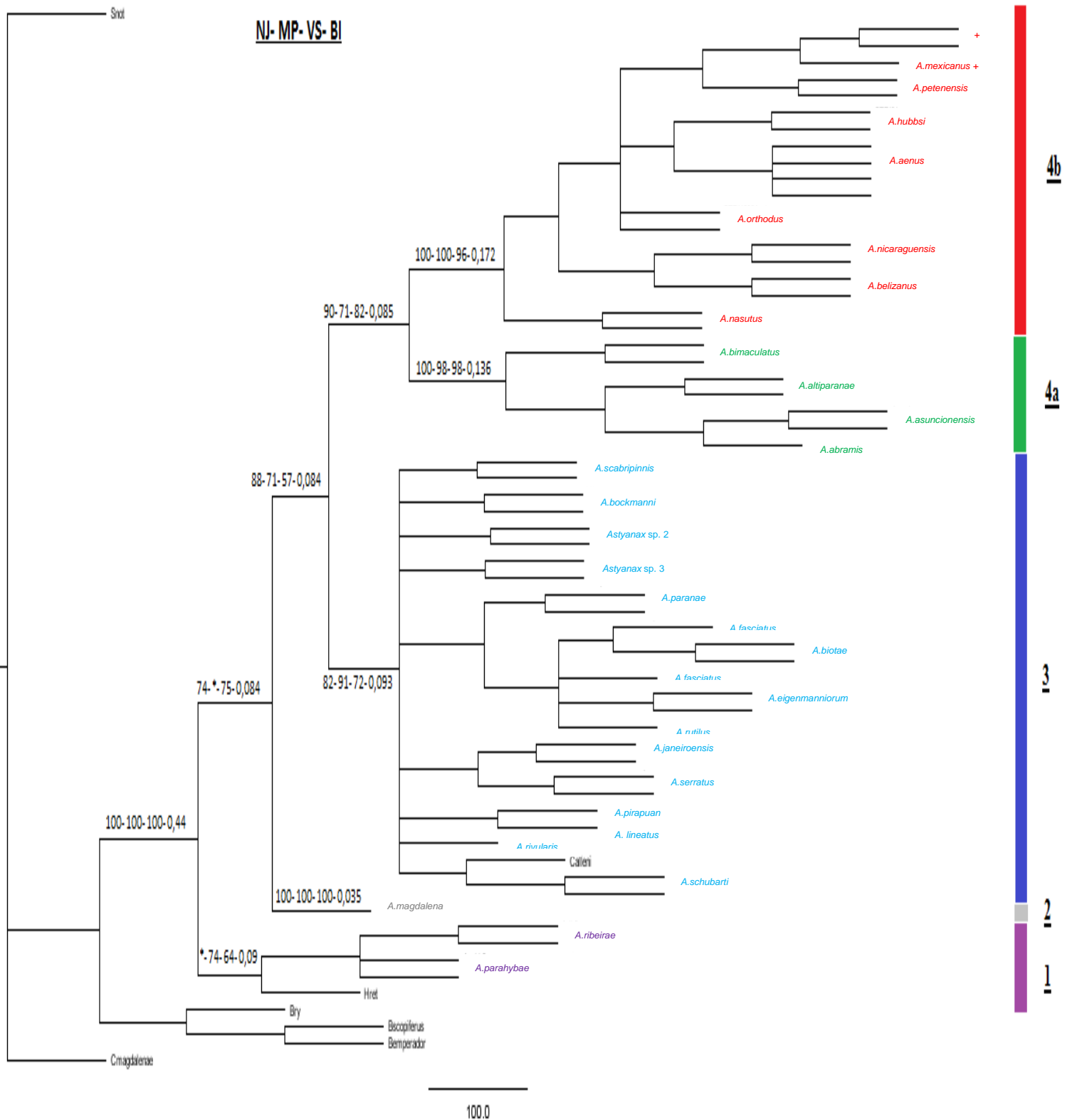


Figura 4: Topologia consenso, para os genes ATPase 6/8 entre os métodos de Neighbor-joining (NJ), Máxima Pársimonia (MP), Verossimilhança (VS) e análise Bayesiana (BI). Valores de *bootstrap* e probabilidade *a posteriori* estão nas bases dos ramos seguindo a ordem das metodologias indicadas acima na figura. Sinal de * indica que o ramo não foi recuperado pela metodologia. Barras coloridas delimitam a posição e tamanho dos clados, enumerados a margem.

Para o gene CitB (figura 3), encontrou-se uma linhagem, bem enraizada pelos grupos externos, com uma única origem para quatro clados bem estruturados, com altos valores de *bootstrap*, onde se agrupam todas as espécies de *Astyanax*. O clado que primeiro divergiu dos demais é composto apenas por indivíduos de *A. ribeirae* da bacia costeira de Riberia de Iguape, no sul do estado de SP (clado I). Sendo seguido pela origem de um segundo clado composto apenas por *A. magdaldena* da bacia do rio Magdalena na Venezuela (clado II) (figura 3).

Por fim separam-se dois clados, sendo que um deles é composto por 10 espécies de *Astyanax* das bacias do Paraná, São Francisco e um riacho costeiro, com a inclusão de *A. rutilus* da Argentina e *Ctenobrycon alleni* (clado III). Observa-se que as espécies *A. scabripinnis* (Bertioga) e *A. paranae* (rio Tibagi, localidade tipo), pertencentes ao complexo *scabripinnis* não são agrupadas juntas dentro do clado III, sendo que a primeira esta mais relacionada com *A. bockmanni* (Rio Grande, Alto Paraná) e a segunda basal para as espécies *A. fasciatus* (rio São Francisco, localidade tipo), *A. rutilus* (Argentina), *A. eigenmanniorum* (rio Cuiabá, bacia Paraguai) e *A. biotae* (rio Paranapanema, Alto Paraná). Dentro do clado III também encontra-se o agrupamento de *A. schubarti* e *C. alleni*, utilizado como grupo externo, curiosamente ambas as espécies apresentam 36 cromossomos, número raro entre os Characidae e único dentro de *Astyanax* (figura 3).

O último clado (clado IV) é composto por dois grupos suportados por altos valores de *bootstrap* e serão tratados aqui como (clado IVA e clado IVB). O clado IVA é composto por todas as espécies do complexo *bimaculatus*, sendo elas *A. altiparanae* (rio Paranapanema, Alto Paraná), *A. bimaculatus* (Argentina), *A. assuncionensis* (rio Cuiabá, bacia do Paraguai). O clado IVB agrupa todas as espécies da América Central, *A. mexicanus*, *A. petenensis*, *A. hubbsi*, *A. aenus*, *A. orthodus*, *A. nicaraguensis*, *A. belizanus*, *A. nasutus*, *A. armandoi*, *A. altior* (figura 3).

Os genes ATPase6/8 (figura 4) apresentam um número maior de indivíduos e de espécies, no entanto as topologias tiveram sua forma global mantida, sendo mais uma vez observada a origem de uma linhagem enraizada pelos grupos externos de onde se originam quatro grandes clados. O primeiro que divergiu dos demais é composto por indivíduos de *A. ribeirae* (rio Riberia de Iguape, bacia costeira), *A. parahybae* (rio Paraíba do Sul, bacia costeira) e *Hyphesobrycon reticulatus* (rio Riberia de Iguape, bacia costeira) (clado 1). Sendo seguido pela origem de um segundo clado composto apenas por *A. magdalena* da bacia do rio Magdalena na Venezuela (clado 2) (figura 4).

Por último separam-se dois clados, sendo que um deles é composto por 15 espécies de *Astyanax* das bacias do Paraná, São Francisco, Iguaçu e um riacho costeiro, com a inclusão de *A. rutilus* da Argentina e *Ctenobrycon alenni* (clado 3). Observa-se que as espécies *A. scabripinnis* (Bertioga) e *A. paranae* (rio Tibagi, localidade tipo), pertencentes ao complexo *scabripinnis* também não são agrupadas juntas dentro do clado 3 nos genes ATPase 6/8, sendo que a relação da primeira com *A. bockmanni* (Rio Grande, Alto Paraná) é recuperada apenas nos métodos de MP e BI; a segunda continua basal para as espécies *A. fasciatus* (rio São Francisco, localidade tipo), *A. rutilus* (Argentina), *A. eigenmanniorum* (rio Cuiabá, bacia Paraguai) e *A. biotae* (rio Paranapanema, Alto Paraná). Observa-se o agrupamento das espécies do rio Iguaçu, *A. serratus* e *A. janeiroensis*, dentro do clado 3. Por fim recupera-se o agrupamento de *A. schubarti* e *C. alleni*, para os genes ATPase 6/8 (figura 4).

O último clado (clado 4) é composto por dois grupos suportados por altos valores de *bootstrap* e serão tratados aqui como clado 4A e clado 4B. O clado 4A é composto por todas as espécies do complexo *bimaculatus*, sendo elas *A. altiparanae* (rio Paranapanema, Alto Paraná), *A. bimaculatus* (Argentina), *A. assuncionensis* (rio Cuiabá, bacia do Paraguai) e *A. abramis* (rio Cuiabá, bacia do Paraguai). O clado 4B agrupa todas as espécies da América Central, *A. mexicanus*, *A. petenensis*, *A. hubbsi*, *A. aenus*, *A. orthodus*, *A. nicaraguensis*, *A. belizanus*, *A. nasutus* (figura 4)

Os resultados entre as metodologias testadas no MEGA 4 (Tamura et al., 2007) e no MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbenck and Ronquist, 2001), são idênticos e congruentes com os apresentados quando utilizamos os genes separados em outros programas (figura 5).

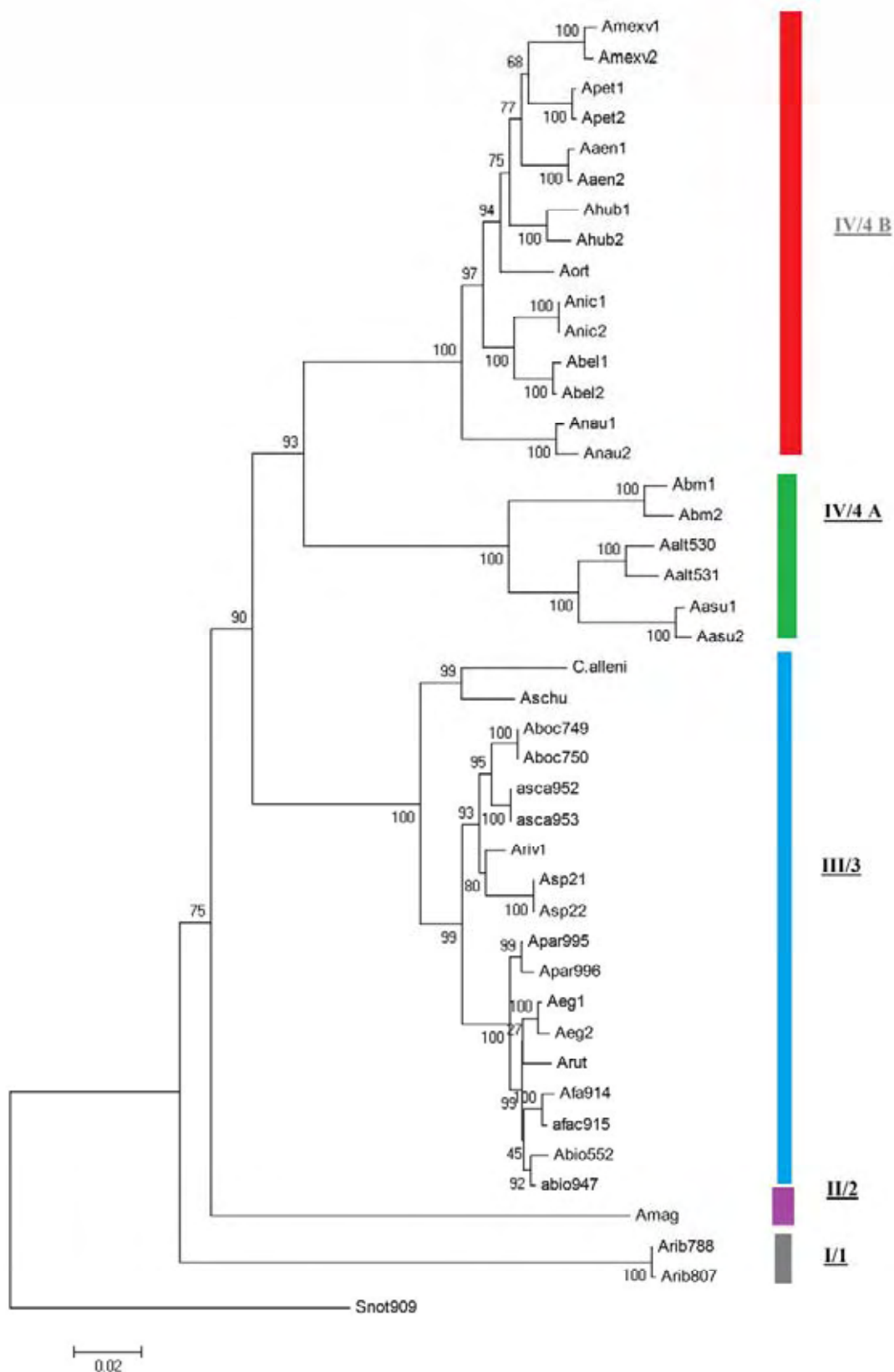


Figura 5: Topologia resultante de Neighbor-joining, com 1000 réplicas de *bootstrap*. Observa-se o resultado congruente com o encontrado quando os genes são trabalhados separadamente.

As distâncias entre os diferentes grupos são apresentadas na mesma ordem dos cladogramas para melhor compreensão, no mesmo intuito, os valores são circundados pelas cores das barras que delimitam os cladogramas nas topologias. O clado I composto apenas por *A. ribeirae* e o clado 1 composto por *A. ribeirae*, *A. parahybae* e *H. reticulatus*, apresentam distâncias congruentes para os dois genes (ATPase6/8 apresentam uma taxa de mutação mais rápida sendo encontradas divergências maiores para esse genes), sendo elas muito altas quando confrontadas com os demais cladogramas. Essas espécies apresentam uma divergência em torno de 20% das demais espécies de *Astyanax* analisadas (figura 6), sendo esse valor próximo ao encontrado em relação as espécies utilizadas como grupo externo, apontando para um evento de cladogênese ocorrido por volta de 26 ma. Tratando apenas do clado 1, a distância entre *A. ribeira* e *A. parahybae* é igual a 7%, similar a encontrada entre diferentes espécies de *Astyanax*, porém o valor das duas espécies contra *H. reticulatus* é superior, ficando em torno de 30% (figura 7).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Aribeirae								
2. Amagdalenae	0.227							
3. Aparanae	0.197	0.171						
4. Abockmanni	0.206	0.185	0.020					
5. Aaltiparanae	0.204	0.210	0.180	0.186				
6. Aassuncionensis	0.209	0.205	0.182	0.190	0.042			
7. Anicaraguensis	0.197	0.198	0.141	0.145	0.149	0.151		
8. Amexicanus	0.202	0.208	0.155	0.164	0.161	0.156	0.056	
9. Bryconamericus	0.246	0.250	0.246	0.247	0.240	0.247	0.239	0.240

Figura 6: Divergência genética, do CitB, entre espécies, sendo destacados os cladogramas a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Aribeirae											
2. Aparahybae	0.070										
3. Hreticulatus	0.324	0.308									
4. Amagdalenae	0.421	0.414	0.351								
5. Abiotae	0.373	0.339	0.293	0.314							
6. Ascabripinnis	0.359	0.344	0.293	0.297	0.028						
7. Aassuncionensis	0.436	0.397	0.370	0.409	0.288	0.287					
8. Abimaculatus	0.431	0.382	0.359	0.392	0.276	0.274	0.208				
9. Amexicanus	0.383	0.361	0.324	0.356	0.239	0.236	0.301	0.266			
10. Anasutus	0.393	0.374	0.302	0.345	0.237	0.234	0.291	0.251	0.090		
11. Bryconamericus	0.471	0.441	0.421	0.493	0.431	0.417	0.505	0.539	0.512	0.499	

Figura 7: Divergência genética, de ATPase6/8, entre espécies, sendo destacados os cladogramas a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

O clado II/2 composto apenas por *A. magdalena*, apresenta divergências altas contra todas as espécies analisadas, sendo que os valores variam de 17% a 50%, para os dois genes (figura 8 e 9). Utilizando o relógio molecular calcula-se um evento de cladogenese próximo (24,6 ma) ao que deu origem ao clado 1/I.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Aribeirae								
2. Amagdalenae	0,227							
3. Aparanae	0,197	0,171						
4. Abockmanni	0,206	0,185	0,020					
5. Aaltiparanae	0,204	0,210	0,180	0,186				
6. Aassuncionensis	0,209	0,205	0,182	0,190	0,042			
7. Anicaraguensis	0,197	0,198	0,141	0,145	0,149	0,151		
8. Amexicanus	0,202	0,208	0,155	0,164	0,161	0,156	0,056	
9. Bryconamericus	0,246	0,250	0,246	0,247	0,240	0,247	0,239	0,240

Figura 8: Divergência genética, do CitB, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Aparahybae									
2. Aribeirae									
3. Abiotae									
4. Ascabripinnis									
5. Aassuncionensis									
6. Abimaculatus									
7. Amexicanus									
8. Anasutus									
9. Bryconamericus									
10. Amagdalenae	0,423	0,430	0,319	0,301	0,417	0,400	0,362	0,351	0,506

Figura 9: Divergência genética, de ATPase6/8, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

O clado III/3 apresenta uma divergência interna de 4,5%, sendo esse valor relacionado com a diferença entre as espécies, já que a divergência interna para cada uma é baixa (figura 10 e 11). O valor é considerado dentro do esperado em um clado com diversas espécies, destaca-se a baixa distância entre *A. bockmanni* e *A. scabripinnis*, em torno de 1%; quando confrontamos *A. paranae* com a segunda espécie a divergência é maior, em torno de 3%. Mesmo valor encontrado entre as espécies *A. schubarti* e *C. alenni*, em torno de 3,5% (figura 12 e 13). Esses valores de divergência apontam para eventos de especiação mais recentes na bacia do Paraná e bacias adjacentes, tendo sua ocorrência entre 2 e 5 ma. As espécies do clado III apresentam valores altos quando confrontados com as espécies de outros clados e grupos

externos; valores acima de 16% contra o clado IV, 18% contra o clado II, 20% contra o clado I e valores acima de 20% contra as espécies utilizadas como grupos externos (figura 12). Os valores para ATPase6/8 são maiores, porém seguem esse padrão entre os clados (figura 13). Utilizando a divergência entre os grupos, calcula-se que o clado III/3 tenha divergido dos demais por volta de 19,2 ma.

	d
1. Aparanae	0.003
2. Abockmanni	0.000
3. Afasciatus	0.002
4. Abiotae	0.011
5. Ascabripinnis	0.000
6. Aeigenmanniorun	0.008
7. Astyanax sp2	0.000
8. Arivularis	n/c
9. Arutilus	n/c
10. Aschubarti	n/c
11. Calenni	n/c

Figura 10: Divergência interna das espécies que compõe o clado III (CitB).

	d
1. Ascabripinnis	0.000
2. Abockmanni	0.000
3. Astyanax sp2	0.000
4. Astyanax sp3	0.005
5. Aparanae	0.005
6. Afasciatus	0.008
7. Ajaneiroensis	0.000
8. Aserratus	0.002
9. Abiotae	0.001
10. Aeigenmanniorum	0.006
11. Aschubarti	0.001
12. Apirapuan	n/c
13. Alineatus	n/c
14. Arivularis	n/c
15. Arutilus	n/c
16. Calenni	n/c

Figura 11: Divergência interna das espécies que compõe o clado 3 (ATPase6/8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Aschubarti															
2. Calenni	0.043														
3. Aparanae	0.068	0.081													
4. Ascabripinnis	0.064	0.078	0.041												
5. Abockmanni	0.065	0.075	0.046	0.015											
6. Afasciatus	0.079	0.094	0.021	0.048	0.053										
7. Abiotae	0.073	0.089	0.020	0.045	0.051	0.018									
8. Aeigenmanniorun	0.069	0.082	0.020	0.044	0.049	0.020	0.014								
9. Arutilus	0.069	0.092	0.023	0.052	0.058	0.025	0.019	0.020							
10. Astyanax sp2	0.063	0.077	0.051	0.031	0.033	0.064	0.059	0.058	0.062						
11. Arivularis	0.061	0.069	0.040	0.021	0.021	0.051	0.046	0.044	0.051	0.021					
12. Aassuncionensis	0.185	0.193	0.185	0.172	0.179	0.193	0.193	0.192	0.193	0.175	0.179				
13. Amexicanus	0.152	0.156	0.157	0.157	0.161	0.171	0.166	0.164	0.172	0.150	0.159	0.158			
14. Amagdalenae	0.193	0.192	0.173	0.184	0.178	0.184	0.188	0.188	0.189	0.169	0.178	0.209	0.211		
15. Aribeirae	0.191	0.206	0.200	0.201	0.202	0.212	0.209	0.211	0.210	0.193	0.202	0.212	0.205	0.231	
16. Bryconamericus	0.235	0.230	0.251	0.244	0.239	0.257	0.252	0.245	0.250	0.237	0.251	0.252	0.245	0.256	0.251

Figura 12: Divergência genética, do CitB, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. Aschubarti																				
2. Calenni	0.052																			
3. Aparanae	0.052	0.074																		
4. Ascabripinnis	0.051	0.071	0.027																	
5. Abockmanni	0.052	0.070	0.024	0.011																
6. Afasciatus	0.052	0.071	0.010	0.029	0.028															
7. Abiotae	0.049	0.070	0.010	0.028	0.026	0.007														
8. Aeigermanniorum	0.058	0.080	0.013	0.033	0.031	0.011	0.011													
9. Anutilus	0.055	0.077	0.010	0.030	0.028	0.008	0.008	0.010												
10. Aserratus	0.060	0.081	0.037	0.038	0.037	0.040	0.040	0.044	0.041											
11. Ajaneiroensis	0.058	0.081	0.036	0.037	0.038	0.040	0.039	0.043	0.040	0.005										
12. Astyanax sp2	0.055	0.071	0.028	0.016	0.019	0.030	0.029	0.034	0.031	0.040	0.036									
13. Astyanax sp3	0.056	0.074	0.027	0.019	0.018	0.030	0.030	0.033	0.029	0.044	0.040	0.019								
14. Anivulans	0.051	0.070	0.022	0.015	0.016	0.024	0.025	0.028	0.024	0.036	0.035	0.018	0.017							
15. Alineatus	0.193	0.193	0.175	0.179	0.175	0.185	0.185	0.185	0.184	0.184	0.186	0.177	0.171	0.174						
16. Apirapuan	0.198	0.201	0.183	0.187	0.181	0.188	0.192	0.192	0.191	0.180	0.185	0.184	0.184	0.184	0.108					
17. Aribeirae	0.360	0.346	0.353	0.348	0.340	0.364	0.361	0.368	0.360	0.364	0.362	0.333	0.347	0.352	0.353	0.423				
18. Amagdalenae	0.318	0.337	0.301	0.289	0.289	0.311	0.306	0.317	0.310	0.298	0.293	0.290	0.297	0.296	0.341	0.343	0.406			
19. Aassuncionensis	0.259	0.239	0.275	0.280	0.271	0.280	0.281	0.284	0.278	0.271	0.271	0.270	0.269	0.278	0.301	0.316	0.421	0.396		
20. Amexicanus	0.234	0.218	0.230	0.231	0.229	0.238	0.234	0.243	0.237	0.240	0.240	0.222	0.222	0.229	0.329	0.303	0.371	0.345	0.292	
21. Byconamericus	0.411	0.442	0.409	0.402	0.405	0.415	0.414	0.414	0.418	0.424	0.417	0.417	0.403	0.413	0.461	0.454	0.452	0.474	0.486	0.492

Figura 13: Divergência genética, de ATPase6/8, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

O clado IV/4A é composto pelas espécies do complexo *bimaculatus*, embora agrupado com o clado IV/4B as espécies desses dois grupos divergem amplamente, com valores em torno de 15%; um pouco superiores são os valores encontrados contra as espécies do clado III/3, acima de 16%; contra o clado II/2 e clado I/1 valores superiores a 20% e contra os grupos externos em torno de 22% (figuras 14 e 15). Os valores entre as espécies do clado não são congruentes entre os genes, sendo que para CitB, *A. altiparanae* apresenta valores iguais a 4% contra *A. assuncionensis* e *A. bimaculatus*, já entre as duas espécies o valor foi igual a 1,5% (figura 14). Ao contrario dos genes ATPase 6/8 que estimam uma divergência em torno de 13% de *A. bimaculatus* contra todas as espécies de *Astyanax*; a divergência de *A. altiparanae* contra *A. assuncionensis* e *A. abramis* fica em torno de 4% e entre as duas últimas igual a 1,6% (figura 15). Os valores de divergência do clado IV/4 contra os demais clados indicam uma separação do mesmo por volta de 19,2 ma, porém com especiações recentes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Aassuncionensis									
2. Aaltiparanae	0.042								
3. Abimaculatus	0.016	0.048							
4. Abockmanni	0.177	0.173	0.178						
5. Abiotae	0.190	0.186	0.190	0.051					
6. Anicaraguensis	0.151	0.149	0.155	0.136	0.145				
7. Amexicanus	0.156	0.161	0.158	0.159	0.164	0.056			
8. Amagdalena	0.206	0.211	0.212	0.176	0.185	0.198	0.208		
9. Anibeirae	0.209	0.205	0.210	0.200	0.206	0.198	0.202	0.227	
10. Bryconamericus	0.248	0.241	0.246	0.235	0.248	0.240	0.241	0.251	0.247

Figura 14: Divergência genética, do CitB, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Aabramis											
2. Aassuncionensis	0.009										
3. Aaltiparanae	0.041	0.042									
4. Abimaculatus	0.113	0.110	0.106								
5. Amexicanus	0.151	0.149	0.136	0.136							
6. Anasotus	0.147	0.145	0.139	0.128	0.050						
7. Abockmanni	0.143	0.141	0.125	0.140	0.122	0.122					
8. Aasenatus	0.143	0.141	0.128	0.143	0.126	0.126	0.021				
9. Amagdalena	0.192	0.188	0.182	0.180	0.169	0.165	0.148	0.152			
10. Anibeirae	0.195	0.195	0.190	0.193	0.178	0.180	0.167	0.176	0.190		
11. Aparahybae	0.183	0.183	0.175	0.178	0.171	0.174	0.160	0.169	0.189	0.040	
12. Bryconamericus	0.215	0.213	0.203	0.222	0.213	0.207	0.186	0.192	0.210	0.199	0.192

Figura 15: Divergência genética, de ATPase6/8, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

O clado IV/4B composto pelas espécies de *Astyanax* da América Central, apresentam uma divergência entre as suas espécies dentro da esperada, uma média de 3% (figura 16 e 17), indicando eventos mais recentes de especiação ocorridos entre 2 e 5 ma. Sua separação do clado IV/4A é calculada por volta de 19 ma.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Amexicanus															
2. Aenus	0.030														
3. Apeteneris	0.031	0.026													
4. Ahubesi	0.040	0.039	0.043												
5. Aorthodos	0.045	0.038	0.040	0.040											
6. Anicaraguensis	0.056	0.047	0.043	0.046	0.040										
7. Abelzarus	0.057	0.047	0.049	0.048	0.043	0.034									
8. Anasutus	0.063	0.051	0.051	0.050	0.048	0.043	0.044								
9. Aaltor	0.031	0.003	0.026	0.040	0.038	0.045	0.048	0.052							
10. Aarmandoi	0.038	0.009	0.030	0.045	0.045	0.052	0.055	0.057	0.010						
11. Aaliparane	0.162	0.152	0.160	0.149	0.156	0.149	0.148	0.151	0.152	0.156					
12. Abiotae	0.165	0.156	0.162	0.159	0.150	0.146	0.150	0.154	0.156	0.159	0.187				
13. Abockmanni	0.160	0.146	0.146	0.149	0.145	0.136	0.140	0.146	0.146	0.151	0.174	0.051			
14. Amagdarena	0.210	0.204	0.203	0.206	0.205	0.199	0.208	0.209	0.204	0.205	0.212	0.186	0.177		
15. Arberae	0.203	0.205	0.207	0.199	0.188	0.199	0.195	0.206	0.207	0.214	0.206	0.208	0.201	0.229	
16. Bryconamericus	0.243	0.241	0.245	0.247	0.232	0.242	0.239	0.252	0.241	0.242	0.243	0.250	0.237	0.253	0.249

Figura 16: Divergência genética, do CitB, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Amexicanus												
2. Aenus	0.020											
3. Ahubesi	0.020	0.015										
4. Apeteneris	0.017	0.018	0.023									
5. Aorthodos	0.018	0.016	0.017	0.021								
6. Anicaraguensis	0.024	0.022	0.028	0.025	0.020							
7. Abelzarus	0.027	0.024	0.026	0.028	0.020	0.008						
8. Anasutus	0.041	0.041	0.037	0.045	0.038	0.040	0.037					
9. Aassuncionensis	0.122	0.123	0.121	0.123	0.122	0.120	0.122	0.119				
10. Ascabipinnis	0.101	0.099	0.100	0.097	0.098	0.102	0.097	0.099	0.119			
11. Amagdarena	0.139	0.136	0.136	0.138	0.136	0.138	0.136	0.136	0.155	0.121		
12. Arberae	0.147	0.147	0.145	0.150	0.146	0.146	0.146	0.149	0.161	0.140	0.157	
13. Bryconamericus	0.177	0.177	0.175	0.176	0.175	0.174	0.177	0.172	0.177	0.153	0.174	0.166

Figura 17: Divergência genética, de ATPase6/8, entre espécies, sendo destacados os clados a quais elas pertencem em colorido (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho).

5. DISCUSSÃO.

O presente trabalho foi desenvolvido sobre o enfoque da filogenética e sistemática molecular de espécies de *Astyanax*, para isso foram analisadas as seqüências dos genes ATPase 6/8 e Citocromo B. Dixon & Hillis (1993) coloca os genes 12SrRNA e 16SrRNA,

dois dos mais conservados genes mitocondriais, como bons marcadores para elucidar a relação filogenética entre taxas que divergiram entre 300 e 65 ma; Simon et. al. (1994) concorda com Dixon & Hillis (1993) e completa que os genes 12S e 16S, possuem regiões variáveis que não estão saturadas com múltiplas substituições, boas para análises populacionais, e regiões conservadas, ideais para obter informações filogenéticas mais antigas. Orti e Meyer (1997) em seu trabalho sobre a radiação dos characiformes, utilizaram os mesmos genes e concluem que eles não são ideais para buscar relações entre taxons que divergiram a 300 ma, como proposto por Dixon & Hillis (1993) e sim até 100 ma.

Entretanto trabalhos atuais sobre a relação de táxons cuja divergência é mais recente, tem tido preferência por utilizar os genes Citocromo B, Citocromo Oxidase I e ATPase6/8, por apresentam uma região conservada, porém uma região variável mais ampla; entre os vertebrados podemos citar os trabalhos (Irwin et. al., 1991; da Silva e Paton, 1993; Graybeal, 1993; Lamb e Lydeard, 1994; Moore e DeFilippis, 1997; Nunn e Stanley, 1998; Hornsby e Motocq, 2011), entre os peixes (Lydeard e Roe, 1997; Martin e Bermingham, 1998; Zardoya e Doadrio, 1999; Lovejoy e de Araujo, 2000; Farias et. al., 2000).

Os genes CitB (figura 3) e ATPase6/8 (figura 4) foram trabalhados separadamente na maior parte do tempo, devido a diferença no numero amostral dos genes, tanto em quantidade de indivíduos, como de numero de espécies.

Exploramos de maneira superficial a concatenação dos genes em nosso trabalho, entretanto ela vem sendo utilizada de maneira cada vez mais frequente com a implementação e pleno domínio de novas opções de análise como a partição de análise do MrBayes ver. 3.1.2 (Huelsenbenck and Ronquist, 2001), o alinhamento utilizando “Direct Opimitization (DO)” do programa POY (Wheeler, 1996 e 2003) e a busca “New Technology” para Parcimônia implemetadas no programa TNT 1.1 (Golobof et. al., 2003) são algumas das novas estratégias que devem ganhar popularidade; recomenda-se a leitura da revisão feita por Blair e Murphy (2010) sobre análises filogenéticas moleculares para maiores informações.

Nosso trabalho é o mais amplo, tanto em número de espécies como em extensão geográfica, já apresentado para o gênero *Astyanax*, cobrindo a maior parte da distribuição do mesmo, abrangendo regiões no extremo sul (Argentina=*A.rutilus*) até o norte da América central (Norte do México=*A. mexicanus*); embora o numero de espécies possa ser considerado alto (30 de *Astyanax*) ele ainda não se aproxima da totalidade do gênero com prováveis mais de 100 espécies. Diversos trabalhos anteriores apontam para a necessidade da resolução de grupos especiosos considerados *incertae sedis* para uma melhor compressão de grupos mais amplos, como famílias e ordens (Oliveira et. al., 2011).

A sistemática do gênero *Astyanax* é confusa e ainda não está resolvida devido à falta de evidências para corroborar seu *status* monofilético, além da grande dificuldade de identificação das espécies que em vários casos se apresentam como prováveis complexos de espécies. (Weitzman & Fink, 1983; Weitzman & Malabarba, 1998; Melo & Buckup, 2006; Bertaco & Garutti, 2007), no entanto, nos últimos anos trabalhos de filogenia utilizando caracteres morfológicos e moleculares vem contribuindo para uma melhor compreensão do gênero.

Mirande (2009), em seu trabalho sobre a filogenia da família Characidae, utilizando medidas morfométricas, recuperou um clado compostos de todas as espécies de *Astyanax* presentes em seu estudo (*A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. lineatus*, *A. pelegri*, *A. correntinus*, *A. troya*, *A. chico*, *A. puka*, *A. endy*, *A. cf. rutilus*, *A. cf. eigenmanniorum*, *A. mexicanus*, *A. paris* e *A. latens*), mais espécies dos gêneros *Markiana*, *Psellogrammus*, *Bryconamericus* e *Hyphessobrycon* e provavelmente *Ctenobrycon* o autor propõe, de acordo com suas análises, que o gênero altamente diversificado *Astyanax*, pode ser diagnosticado como monofilético com relativas poucas alterações em sua composição.

O presente trabalho corrobora as evidências morfológicas já que todas as espécies de *Astyanax* são recuperadas em um mesmo ramo, com a inclusão de *Hyphessobrycon* e *Ctenobrycon*. Infelizmente a maior parte das espécies que Mirande (2009) analisou não estão presentes nesse trabalho, porém observamos que Mirande (2009) também resgata uma relação próxima de *A. rutilus* com *A. eigenmanniorum*, assim como de *A. abramis* com *A. asuncionensis*, no entanto o agrupamento das duas últimas não está intimamente relacionada com *A. mexicanus*.

Orti G. & Meyer A. (1997), em um trabalho sobre a radiação dos characiformes, suportam a monofilia proposta por Mirande (2009), utilizando os genes mitocondriais 12SrRNA e 16SrRNA, os autores recuperaram um clado composto pela espécie *Astyanax fasciatus*, porém agrupados com espécies dos gêneros *Oligosarcus* e *Poptela*, o baixo número de espécies impossibilita uma discussão mais profunda desse trabalho com o presente.

Calcagnotto et al. (2005), em seu estudo sobre as famílias de characiformes, negam a monofilia para a família Tetragonopterinae (onde se locava, no passado, *Astyanax*), no entanto apontam para a alta probabilidade de, em futuros trabalhos, serem resgatadas a monofilia para alguns grupos de tetras. Em seu trabalho são apresentadas duas espécies de *Astyanax* (*A.*

scabripinnis e *A. bimaculatus*) que se agrupam com os gêneros *Astyanacinus*, *Moenkhausia*, *Inpaichthys*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*. Nesse clado estão as espécies com cinco ou mais dentes na série interna da premaxila (Calcagnotto et. al., 2005).

Javonillo et al., (2010), em um trabalho sobre as relações entre as principais linhagens dos peixes characideos, baseado em seqüências de 3 genes mitocôndrias (12SrRNA, 16SrRNA e COI) e um nuclear (RAG2), observou um agrupamento de todas as espécies de *Astyanax* de seu estudo (*A. cremnobates* e *A. mexicanus*) com os gêneros *Oligosarcus* e *Hyphessobrycon*, porém, não corroboram evidências anteriores quando ao monofiletismo do grupo, sendo negado para *Astyanax*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*, embora todas as espécies de *Astyanax* estejam em um mesmo ramo com alto suporte estatístico na base, curiosamente *Ctenobrycon* é encontrado no ramo irmão de *Astyanax*.

Oliveira et. al. (2011) apresentam o trabalho mais completo sobre a filogenia da família Characidae, incluindo todas as sub-famílias do grupo, utilizando genes mitocondriais (16SrRNA e CitB), nucleares (Myh6, RAG1 e RAG2) e caracteres morfológicos. De acordo com os autores, seus resultados não suportam monofilia nos gêneros *Astyanax*, *Hemigrammus*, *Hyphesobrycon* e *Jupiaba*. O trabalho apresenta três espécies de *Astyanax* (*A. mexicanus*, *A. jordani* e *A. aenus*) que são agrupadas em uma mesma linhagem com o gênero *Bramocharax*. Ornelas-Garcia et. al. (2008) em seu trabalho, com espécies de *Astyanax* na América Central, sinonimiza os dois gêneros, pois, as divergências encontradas entre indivíduos dos dois gêneros em uma mesma localidade, eram muito baixas (<1%), menores do que as observadas entre espécies do mesmo gênero. Ainda encontramos no trabalho de Oiveira et. al. (2011) *Ctenobrycon hauxwelianus*, em um ramo irmão ao de *Astyanax* e *Hyphesobrycon reticulatus* dentro do chamado “clado 52” pelos autores, que esta em concordância com o “clado C” de Javonillo et. al. (2010), onde também encontramos *Astyanax*.

Focando em *Astyanax*, existem diversos trabalhos clássicos na área da citogenética, assim como constantemente descrições de novas espécies são feitas, porém poucos trabalhos relacionam filogeneticamente as espécies do gênero, os que se destacam são discutidos abaixo.

Strecker et. al. (2004), utilizam parte do gene CitB, para fazer inferências sobre as colonizações das cavernas subaquáticas da América Central e do Norte, por espécies do gênero *Astyanax*. Os autores utilizam as espécies *A. mexicanus*, *A. aenus*, *A. altior* e *A. fasciatus*, propondo que todas devam ser sinonimizadas em *A. fasciatus* devido as baixas divergências genéticas entre elas. Em nosso trabalho não observamos o agrupamento das três

espécies da América Central em uma mesma linhagem sendo que a divergência de *A. mexicanus* para as outras duas é de 3%, já entre *A. altior* e *A. aeneus* a distância realmente é baixa, 0,3%. *A. fasciatus* é um complexo de espécies, em nosso trabalho ela não aparece no mesmo clado das espécies da América Central, já que nossos indivíduos são originários da bacia do São Francisco, sendo essa a localidade tipo da espécie, apresentando altas divergências com as espécies da América Central (>15%); a espécie utilizada por Strecker et. al. (2004), não é *A. fasciatus*, sendo necessária uma ampla revisão taxonômica na mesma para que sejam reconhecidas as diferentes espécies.

Ornelas-Garcia et. al. (2008), utilizaram genes mitocondriais (16S, CiB e COI) e um gene nuclear (RAG1), para contar a história evolutiva do gênero *Astyanax* na América Central, com uma amostragem de 10 espécies de *Astyanax* (*A. aeneus*, *A. altior*, *A. armandoi*, *A. fasciatus*, *A. jordani*, *A. mexicanus*, *A. nasutus*, *A. nicaraguensis*, *A. orthodus* e *A. petenensis*) e três de *Bramocharax*, com 208 indivíduos de 141 localidades. Entre os resultados destaca-se o cálculo da taxa de divergência para o gene CitB igual a 0,8%/ma, onde foram utilizados os seguintes eventos para chegar a esse valor: 1) O soerguimento, entre 8 e 12 ma atrás, das serras Merida-Perija; 2) A presença do fóssil de *Colossoma macropomum* na bacia do rio Magdalena, com datação superior a 15 ma; 3) A formação, entre 3 e 6 ma atrás, do Cinturão vulcânico trans-mexicano (TMVB). O valor encontrado, para taxa de divergência de 0,8%/ma, é similar a observada para outros grupos de peixes como Ciclideos (0,7%) (Cocheiro et. al., 2007) e Cobitidae (0,68%) (Doadrio e Perdices, 2005).

Para a sistemática do gênero, outros avanços foram feitos com o trabalho de Ornelas et al. (2008), os autores propõe a inclusão de *Bramocharax* dentro dos *Astyanax*, já que todos os indivíduos desse gênero utilizados no trabalho são agrupados com as espécies de *Astyanax* com a qual estão em simpatria, apresentando valores de divergência inferiores a 1%, esses menores do que os encontrados entre as espécies do mesmo gênero. As diferenças morfológicas observadas em *Bramocharax* são associadas a adaptação a vida lacustre de linhagens de *Astyanax*, conhecidos por sua plasticidade adaptativa. Os autores ainda propõem uma divisão de espécies baseada em clados monofiléticos, distribuição geográfica, localidade tipo das espécies e divergência genética associada a eventos de cladogenese conectados por uso do relógio molecular.

Assim os autores reconhecem as espécies: *A. mexicanus* (clade Ia), mais relacionada com *A. aeneus* (clade Ib), sendo *A. petenensis* (clade Ic) basal para as duas. Com origem independente ao “Clade I” esta *A. hubbsi* (clade II), fechando o “Group I”. No “Group II” estão *A. belizanus* (clade VI), *A. nicaraguensis* (clade VII) e *A. nasutus* (clade VIII), outros

clados são propostos porém como ainda não foram descritas espécies tipo para as localidades geográficas elas recebem a nomeação *A. sp* e esperam pela confirmação de trabalhos de taxonomia para serem descritas. Sendo a localidade tipo de *A. fasciatus* a bacia do São Francisco, a espécie não é suportada no clado da América Central.

Nossos resultados são similares aos encontrados por Ornelas-Garcia et. al. (2008), ambas as topologias finais resgatam um grupo contendo *A. mexicanus*, *A. aeneus*, *A. petenensis* e *A. hubbsi* (“Group I” de Ornelas-Garcia et. al. (2008). Com um segundo ramo contendo *A. belizanus*, *A. nicaraguensis* e *A. nasutus* (“Group II” de Ornelas-Garcia et. al. (2008). A divergência apresentada no trabalho, entre o “Group I” e “Group II”, é igual a 4,65%, os grupos apresentam divergência interna de 3,25% e 2,86% respectivamente. No presente trabalho as divergências entre as espécies da América Central ficou em entre 2,6% (entre *A. petenensis* e *A. aeneus*) e 6,4% (entre *A. nasutus* e *A. mexicanus*), valores similares aos encontrados por Ornelas-Garcia et. al. (2008).

No trabalho acima ainda é aceita a proposta de colonização da América Central por indivíduos da América do Sul, porém os autores propõem que ela tenha sido anterior ao soerguimento do Istmo do Panamá (3,3 ma), tendo ocorrido entre 7,8 e 8,1 ma atrás através de paleocanais, sendo que as espécies do Panamá (*A. sp*, Group V e *A. sp.*, Group VI) estão mais relacionadas com as espécies, utilizadas como grupo externo, *A. fasciatus* e *A. bimaculatus*.

As datações propostas por Ornelas-Garcia et al. (2008) estão em concordância com outros apresentados para peixes primariamente de água doce. Bermingham e Martin (1998) encontram essa datação para colonização da América Central para três gêneros (*Pimelodella*, *Hypopomus* e *Roeboides*). Perdices et. al. (2002), apontam para mais de um evento de colonização por parte do gênero *Rhamdia* na América Central, sendo o primeiro entre 5,6 e 6,5 ma atrás.

Nossos dados não concordam com os de Ornelas-Garcia et. al. (2008), já que as divergências entre as espécies da América Central e do Sul são sempre por volta de 15%, mesmo entre as do grupo *bimaculatus*, agrupados com as espécies da América Central; quando tratadas como três grupos encontra-se uma divergência interna de 4%, para América Central, 7% para América do Sul e 3% para o grupo *bimaculatus*, entre os grupos os valores são de 15,9% e 15,6% para América Central contra América do Sul e grupo *bimaculatus* respectivamente. Utilizando a taxa de 0,8%/ma encontra-se um evento de separação desses dois grupos por volta de 20 ma atrás, valor muito superior ao encontrado em trabalhos anteriores.

Por outro lado, tendo em vista que a diferenciação entre espécies do clado IV/4B só poderia começar a ocorrer após a colonização de novos ambientes que limitassem o fluxo gênico entre grupos, pode-se calcular o evento de colonização de *Astyanax* na América Central utilizando a divergência interna do clado IV/4B, dessa forma chegamos a um valor, mais próximo ao encontrado por Ornelas-Garcia et al. (2008), igual a 4,5 ma, sendo essa datação em concordância com um evento de colonização anterior ao soerguimento do Istmo do Panamá.

Em nosso trabalho observamos uma grande divergência genética entre os grupos de *Astyanax*, um forte suporte de *bootstrap* na formação dos cladogramas e diversas linhagens evolutivas, essas são evidências de uma separação muito ancestral dos grupos, sendo esse o estudo mais abrangente das espécies de *Astyanax* do continente Americano. Trabalhos relacionando espécies de regiões específicas da América do Sul são discutidos abaixo.

Em sua dissertação de mestrado, Melo (2009), analisa os *Astyanax* da bacia do Iguaçu, em suas análises foi observada a locação de *A. bockmanni* em um grupo junto com *A. fasciatus*, *A. aff. paranae* e a espécie endêmica da bacia do Rio Iguaçu, *Astyanax* sp. C, sendo a menor divergência genética encontrada com a mesma (3,4%), contra 6,8% para *A. fasciatus* e 4,7% para *A. aff. paranae*. Em nosso trabalho, também encontramos um clado contendo as espécies *A. bockmanni*, *A. paranae* e *A. fasciatus* (clado III/3), com valores de divergência iguais a 4,6% e 5,4% para *A. bockmanni* contra *A. paranae* e *A. fasciatus* respectivamente.

As relações filogenéticas entre *A. bockmanni* e outras espécies do gênero são discutidas em Pazza et al., (2006) que propõem uma maior relação da espécie com *A. fasciatus* por ambas apresentarem semelhanças na distribuição do rDNA 5S. No entanto Kavalco (2008), apresenta as dificuldades de inferir relações evolutivas para a espécie, pois apesar de apresentar semelhanças nos padrões de distribuição do rDNA 5S, o mesmo não acontece para a região satélite As-51 ausente em *A. bockmanni* e presente em *A. fasciatus*.

Melo (2009) também recuperou um clado contendo *A. altiparane* e suas espécies irmãs originárias do complexo *A. bimaculatus*; as distâncias genéticas apresentadas entre essas espécies foram relativamente baixas (*A. alt-* *A. abramis*= 3,6%, *A. alt-* *A. assunseonensis*= 1%, *A. alt-**A. bimaculatus*= 2,6%) quando comparadas as distâncias apresentadas entre a espécie em questão e as restantes do presente trabalho, sendo a menor igual 17,5% contra *A. bockmanni*. Nosso trabalho condiz com os resultados de Melo (2009) sendo encontrada uma divergência média superior a 16% entre as espécies do grupo *bimaculatus* (clado IVa/4a) e as demais da América do Sul (clado III/3). As divergências dentro do clado IVa/4a, não são condizentes entre os genes, sendo que para o CitB encontra-

se 4,8% e 4,2% para *A. altiparanae* contra *A. bimaculatus* e *A. assuncionensis* respectivamente; entre as duas ultimas 1,6% de divergência. Para os genes ATPase 6/8 as divergências estão em torno de 13% para *A. bimaculatus* contra todas as espécies de *Astyanax*; para *A. altiparanae* contra *A. assuncionensis* e *A. abramis* ela fica em torno de 4% e entre as duas ultimas igual a 1,6%.

Kavalco et al., 2011, ao fazer análise cromossômicas e de seqüências de DNA, entre populações das espécies *A. altiparanae*, oriundas do Alto Paraná, e *A. bimaculatus* das bacias costeiras vizinhas, recuperou o monofiletismo para as duas espécies.

Pie et al. (2009), trabalhando com o gene mitocondrial D-loop, no alto rio Iguazu, encontrou alguns complexos de espécies no gênero *Astyanax*; a única espécie descrita utilizada no trabalho foi *A. altiparanae* que se encontra em monofilia, porém os autores chamam a atenção para dois haplótipos muito divergentes vivendo em simpatria na região e discutem que o que antes era chamado de diversidade ecológica de *A. altiparanae*, tanto em dieta (Luz & Okada, 1999) como em comportamento (Suzuki & Orsi 2008) pode estar relacionada com o fato de estarem trabalhando com mais de uma espécie. Outros estudos vão de encontro a essa hipótese, sendo observada uma diferenciação entre populações distantes geograficamente, pelos métodos de RFLP, RAPD e Aloenzimas (Moysés & Almeida-Toledo, 2002; Leuzi et al., 2004).

Encerramos propondo um processo de dispersão e colonização para o gênero *Astyanax*, que se originou em um momento de regressão marinha, por volta de 26 ma atrás (clado I/1), tendo originado primeiramente as espécies costeira *A. ribeirae* e *A. parahybae* que se divergiram com o regresso do nível do mar tendo elas se especiadas cada uma em sua bacia posteriormente (figura 18).

As proto-espécies dessa linhagem deveriam apresentar uma ampla distribuição, visto que a próxima espécie a se divergir foi *A. magdalena* na bacia do rio Magdalena na Venezuela, por volta de 24,6 ma atrás (clado II/2), nesse momento ocorria uma mistura entre as faunas amazônicas e da bacia do Paraná, sendo que duas linhagens se separaram uma colonizando as bacias ao sul da América do Sul (clado III/3), por volta de 19,2 ma atrás, com subseqüentes eventos de especiação e colonização mais recentes entre 1 e 6 ma atrás; e outra que se diferencia em dois grupos sendo que um deu origem ao grupo *bimaculatus* (clado IVa/4a), ocorrendo uma segunda dispersão para as bacias do sul da América do Sul e outro vai colonizar a América Central (clado IVb/4b) sendo que a separação desses dois grupos ocorreu por volta de 19 ma atrás, com subseqüentes eventos de especiação mais recente por volta de 6 ma atrás para os dois cladogramas (figura 18).

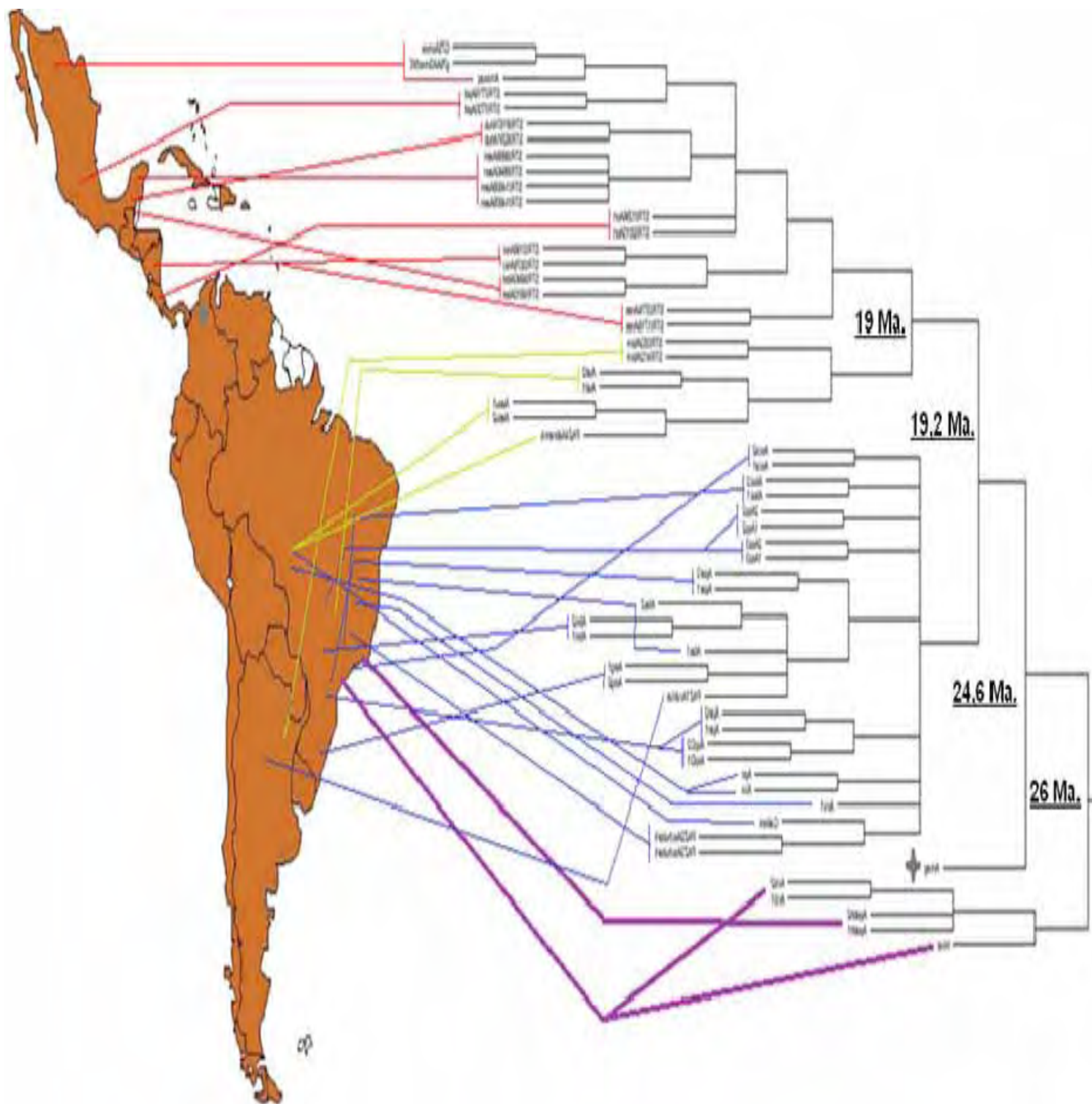


Figura 18: Mapa Centro-Sul americano relacionando às espécies com seu local de coleta são utilizadas cores para indicar os clados a qual cada uma pertence (1/I=Cinza, 2/II=Roxo, 3/III=Azul, 4/IVA=Verde, 4/IVB=Vermelho). Datações para as separações dos clados estão na base dos ramos.

Com o crescimento dos trabalhos na área de sistemática molecular e filogeografia, novas evidências vão sendo reveladas acrescentando diferentes peças ao quebra-cabeça da história evolutiva desse gênero, que tem sua diversidade cada vez mais explorada pelo meio acadêmico.

Nosso trabalho veio no sentido de contribuir nessa investigação aumentando os dados sobre as relações das espécies no gênero assim como sobre sua origem e dispersão abrangendo praticamente toda a distribuição do gênero e um elevado número de espécies, sendo o trabalho mais completo sobre as relações entre espécies centro e sul americanas, assim como somente entre espécies sul americanas, criando base para novas pesquisas que devem aumentar o número de espécies, assim como acrescentar novos genes preferencialmente nucleares.

6. CONCLUSÕES.

- Obtivemos quatro clados bem estruturados, com altos valores de *bootstrap* na base dos ramos; sendo o Clado 4/IV dividido em dois sub-clados. Os Clados estão em concordância com a distribuição geográfica das espécies ou com a taxonomia vigente.
- Altos valores de divergência genética entre os clados, apontam para separações muito antigas ou para uma falta de monofiletismo em *Astyanax*, sendo a última apoiada pela inserção de dois diferentes gêneros entre *Astyanax*.
- Origem do gênero na América do Sul, colonizando posteriormente a América Central, antes do soerguimento do Istmo do Panamá.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALVES, AL; MARTINS-SANTOS, IC. (2002). **Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) with 2n=48 chromosomes.** *Cytologia*, 67:117-122
- BAKER, A.M., HUGHES, J.M., DEAN, J.C., BUNN, S.E., 2004. **Mitochondrial DNA reveals phylogeographic structuring and cryptic diversity in Australian freshwater macroinvertebrate assemblages.** *Marine and Freshwater Research* 55, 629–640.
- BERMINGHAM, E; McCAFFERTY, SS e MARTIN AP (1997). **Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamian Isthmus.** In: Kocher T, Stepien CA (Eds.), *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 113-128.
- BERMINGHAM E, MARTIN AP. 1998. **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** *Mol Ecol* 7(4):499-517.
- BERTACO, V. MALABARBA, LR. (2001). **Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of the Southern Brazil, with comments on the *A. scabripinnis* species complex.** *Ichthyol. Explor. Freshwaters*. 12 (3): 221-234.
- BERTACO, V. LUCENA, CAS. (2006). **Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex.** *Neotrop. Ichthyol.* 4(1): 53-60.
- BERTACO, V. GARUTTI, V. (2007). **New *Astyanax* from the upper rio tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae).** *Neotrop. Ichthyol.* 5(1): 25-30.
- BLAIR C., MURPHY R. 2010. **Recent Trends in Molecular Phylogenetic Analysis: Where to next?** *Journ. Of Hered.* 102:130-138.
- BRITSKI, H. A. 1964. **Sobre uma nova espécie de *Astyanax* do Rio Mogi-Guassu (Pisces: Characidae).** *Pap. Avul., Dept. Zool., Sec. Agri., SP*, 16: 213-215.
- BRITSKI, H. A. & LANGEANI, F. 1988. ***Pimelodus paranaensis*, sp. n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil.** *Rvta. Bras. Zool.* 5 (3): 409-417.
- BRITTO, M. R. & CASTRO, R. M. C. 2002. **New Corydoradinae Catfish (Siluriformes: Callichthyidae) from Upper Paraná and São Francisco: The Sister Group of *Brochis* and most *Corydoras* species.** *Copeia*, (4): 1006-1015.
- BUCKUP, P.A. 1998. **Relationship of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Characiformes).** In: Malabarba, L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena M.S. e Lucena C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

- CALCAGNOTTO D., SCHAEFER S.A., DESALLE R. 2005. **Relationship among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:135-153.
- CASATTI, L. & CASTRO, R. M. C. 1998. **A fish community of the São Francisco River headwater riffles, southeastern Brazil.** *Ichthyol. Explor. Freshwaters.* 9 (3): 229-242.
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F., FERREIRA, K. M.; et al. **Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil.** *Biota Neotropica*, v3 (n1). 2003
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F., MELO, A L.; et al. **Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil.** *Biota Neotropica*, v4 (n1). 2004
- CASTRO R.M.C.; CASATTI L, SANTOS HF, VARI RP, MELO ALA, et al. **Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil.** *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 6(3): 193-214. 2005
- CASTRO, R. M. C. & VARI, R. P. 2004. ***Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the Rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae).** *Proc. Biol. Soc. Washington* 117 (3): 330-338.
- COLBORN, J., CRABTREE, R.E., SHAKLEE, J.B., PFEILER, E., BOWEN, B.W., 2001. **The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish.** *Evolution* 55, 807–820.
- COLLIN, R., 2000. **Phylogeny of the *Crepidula plana* (Gastropoda: Calyptraeidae) cryptic species complex in North America.** *Can. J. Zool.* 78, 1500–1514.
- CONCHEIRO PEREZ GA, RICAN O, ORTI G, BERMINGHAM E, DOADRIO I, ZARDOYA R. 2007. **Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene.** *Mol Phylogenet Evol* 43(1):91-110
- CUVIER, G. 1819. **Sur les poissons du sous-genre *Hydrocyon*, sur deux nouvelles espèces de *Chalceus*, sur trois nouvelles espèces du *Serrasalmes*, et sur l' *Argentina glossodonta* de Forskahl, qui est l' *Albula gonorrhynchus* de Bloch.** *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat.* 351-379.
- DA SILVA MNF, PATTON JL. 1993. **Patterns of evolutionary divergence in arboreal Amazonian echimyid rodents: the perspective of mtDNA sequence variation.** *Mol Phyl Evol* 2:243–255.
- DAWSON, M.N., JACOBS, D.K., 2001. **Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa).** *Biol. Bull.* 200, 92–96.
- DAWSON, M.N., Sen Gupta, A., England, M.H., 2005. **Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11968–11973.

- DIXON, M.T & HILLIS D.M. 1993. **Ribosomal RNA secondary structure: Compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis.** *Mol. Biol. Evol.* 10:256-267
- DOADRIO I, PERDICES A. 2005. **Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis, cobitidae) based on cytochrome b sequence data.** *Mol Phylogenet Evol* 37(2):484-493.
- EIGENMANN, C. H. 1911. **New characins in the collection of Carnegie Museum.** *Ann. Carn. Mus.*, 8 (1): 164-181.
- EIGENMANN, C. H. 1912. **The freshwater fishes of British Guiana, including a study of ecological grouping of species and the relation of the fauna of the plateau to that of the lowlands.** *Mem. Carnegie Mus.* 5: 1-578
- EIGENMANN, C. H. 1914. **Some results from studies of South American Fishes.** *Indiana University Stud.*, 20: 20-48.
- EIGENMANN, C. H. 1917. **The American Characidae. Part 1.** *Memoirs of Museum of Comparative Zoology*, 43: 1-102.
- EIGENMANN, CH (1921) **The American Characidae. Part 3.** *Mem. Mus. Comp. Zool*, 43: 208-310.
- EIGENMANN, C. H. 1927. **The American Characidae.** *Mem. Mus. Comp. Zool.* XLIII (4): 311-428.
- EIGENMANN, C. H. & MYERS G.S. 1929. **The American Characidae.** *Mem. Mus. Comp.* 43: 429-558.
- ESCHMEYER, W.N., FONG, J.D., 2009. **Species of Fishes by family/subfamily, ver. 13.** WorldWideWebelectronicpublication:<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.html/>.
- FARIAS IP, MEYER A, ORTÍ G 2000. **Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlids fishes.** *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 288:76-92
- FARRIS JS, KALLERSJO M, KLUGE AG, BULT C (1994). **Testing significance of incongruence.** *Cladistics* 10, 315-319.
- FELSENTEIN, J. (1985). **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** *Evolution* 39, 783-791.
- FERNADES C.A. & MARTINS-SANTOS I.C. 2004. **Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes).** *Hereditas* 141: 328_ 332
- FRANKHAM R. 2010. **Where are we in conservation genetics and where do we need to go?** *Conservation Genetics* 11: 661-663.

- GARAVELLO J.C. & SAMPAIO F.A.A. 2010. **Five new species of genus *Astyanax* Baird & Gerard, 1854 from rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. Braz. J. Biol. 70:847-865
- GARUTTI, V. & BRITSKI, H. A. 2000. **Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia**. Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool. Porto Alegre 65-88.
- GÉRY, J. 1977. **Characoids of the world**. T. F. H. Publications, Inc., N. J. 672 p.
- GODOY, M. P. 1970. **Nova espécie de *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Pisces: Characidae: Heterognathi)**. Rev. Bras. Biol. 275-279.
- GOETZE, E., 2003. **Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae**. Proc. R Soc. Lond., B 270, 2321–2331.
- GOLOBOFF, P., FARRIS, J., NIXON, K., 2003. **T.N.T.: tree analysis using new technology**. Program and documentation available from the authors, and at: www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- GRAYBEAL A. 1993. **The phylogenetic utility of cytochrome *b*: lessons from bufonid frogs**. Mol Phy Evol 2:256–269
- HOARE, K., GOLDSON, A.J., GIANNASI, N., HUGHES, R.N., 2001. **Molecular phylogeography of the cosmopolitan bryozoan *Celleporella hyalina*: cryptic speciation?** Mol. Phylogenet. Evol. 18, 488–492.
- HOLLAND, B.S., DAWSON, M.N., CROW, G.L., HOFMANN, D.K., 2004. **Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands**. Mar. Biol. 145, 1119–1128.
- HORNSBY A.D. & MATOCQ M.D. 2011. **Differential regional response of the bushy-tailed woodrat (*Neotoma cinera*) to late Quaternary climate change**. Journ. of Biogeogr.
- HUELSENBECK, JP e RONQUIST, FR (2001). **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees**. Bioinformatics 17, 754–755.
- IRWIN DM, KOCHER TD, WILSON AC. 1991. **Evolution of cytochrome *b* gene in mammals**. J Mol Biol Evol 2:13–34
- JAVONILLO R., MALABARBA L.R., WEITZMAN S.H., BURNS J.R. 2010. **Relationship among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data**. Molecular Phylogenetics and Evolution 54: 498-511.
- KAVALCO KF. 2008. **Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. São Paulo – SP: PhD Thesis, University of São Paulo.

- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K.D.O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2011. **Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *Bimaculatus* (Teleostei, Characidae)**. Cytogenetic and Genome Research, 1-12
- KING, J.L., HANNER, R., 1998. **Cryptic species in a “living fossil” lineage: taxonomic and phylogenetic relationships within the genus *Lepidurus* (Crustacea: Notostraca) in North America**. Mol. Phylogenet. Evol. 10, 23–36
- KIRKENDALE, L.A., MEYER, C.P., 2004. **Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Lottidae): diversification in a dispersal-driven marine system**. Mol. Ecol. 13, 2749–2762.
- KITAURA, J., NISHIDA, M., WADA, K., 2002. **Genetic and behavioral diversity in the *Macrophthalmus japonicus* species complex (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae)**. Mar. Biol. 140, 1–8.
- KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PAABO S., VILLABLANCA F.X., WILSON A.C. 1989. **Dynamics of Mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers**. Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 6196-6200.
- LAMB T, LYDEARD C. 1994. **A molecular phylogeny of the gopher tortoises, with comments on familial relationships within the Testudinoidea**. Mol Phyl Evol 3:283–291
- LANGEANI, F. 1989. **Ictiofauna do Alto Curso do Rio Tietê (SP): Taxonomia**. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto (dissertação de mestrado), 231 pp.
- LEUZZI, M. S. P., ALMEIDA, F. S., ORSI, M. L. & SODRE, L. M. K. 2004. **Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil**. Genetics and Molecular Biology 27, 355–362.
- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; 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.; CASATTI L. & BERTACO, V. A. 2003. **Genera *incertae sedis* in Characidae**. p. 106-168. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- LINNAEUS, C. 1758. **Systema Naturae, Ed. X**. (Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata.). Holmiae
- LINKE, S., PRESSY, R.L., BAILEY, R.C., NORRIS, R.H., 2007. **Management options for river conservation planning: condition and conservation re-visited**. Freshwater Biology 52, 918–938.
- LIU, H.-P., HERSHLER, R., CLIFT, K., 2003. **Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail**. Molecular Ecology 12, 2771–2782.

LOVEJOY NR, DE ARAUJO MLG 2000. **Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis***. *Mol Ecol* 9(3):259–268

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

LUCENA, C.A.S. 1993. **Estudo filogenético da família Characidae com discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo.

LUZ, K. D. G. & OKADA, E. K. 1999. **Diet and dietary overlap of three sympatric fish species in lakes of the Upper Paraná River Floodplain**. *Archives of Biology and Technology* 42, 441–447.

LYDEARD C, ROE KJ 1997. **The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome *b* gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes**. In: Kocher TD, Stepien CA (eds) *Molecular systematic of fish*. Academic Press, New York, pp. 285–303

MACHADO-ALLISON, A. 1983. **Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei-Characidae). Parte II. Discusion sobre la condici n monofiletica de la subfamilia**. *Acta Biol. Venez.* 11, 145–196.

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

MALABARBA, L.R., 1998. **Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi, Characidae)**. In: Malabarba, L., Reis, R., Vari, R., Lucena, Z.M.S., Lucena, C. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 193–234.

MALABARBA, L.R., WEITZMAN, S.H., 2003. **Description of a new genus with six species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. *Comun. Mus. Cie^{nc}. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool.* 16, 67–151.

MARGULES, C.R., PRESSEY, R.L., 2000. **Systematic conservation planning**. *Nature* 405, 243–253.

MARTIN AP, BERMINGHAM E 1998. **Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome *b* gene sequence**. *Mol Phyl Evol* 9:192–203

MARTIN, A.P., BERMINGHAM, E., 2000. **Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish**. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 267, 1135–1141.

MELO, R. 2009. **Relações filogenéticas e biogeográficas entre espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei – Characidae) das bacias do rio Iguaçu, do alto rio Paraná e do rio**

Paraguai baseadas em sequências de gene mitocondrial. Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Dissertação de mestrado.

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

MILLER, K., ALVAREZ, B., BATTERSHILL, C., NORTHCOTE, P., PARTHASARATHY, H., 2001. **Genetic, morphological, and chemical divergence in the sponge genus *Latrunculia* (Porifera: Demospongiae) from New Zealand.** Mar. Biol. 139, 235–250.

MIRANDE J.M. 2009. **Weighted parsimony phylony of the family Characidae (Teleostes: Characiformes).** Cladistics 25: 1-40.

MIRANDE J.M. 2010. **Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characidae): from characters to taxonomy.** Neotrop. Ichtyo. 8:385-568.

MIYA, M., NISHIDA, M., 1997. **Speciation in the open ocean.** Nature 389, 803–804.

MOCKEVICH, MF e FARRIS, JS (1981). **The implications of congruence in *Menidia*.** Syst. Biol. 30, 351-370

MOORE WS, DEFILIPPIS VR. 1997. **The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome *b*.** In: Mindell DP (ed) Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, New York, pp. 83–120

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

MORITZ C, SCHNEIDER CL, WAKE DB. 1992. **Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation.** Syst Biol 41:273–291

MOYSÉS, C.B. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2002. **Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae).** Genetics and Molecular Biology, 25, 4, 401-407

NELSON J.S. 2006. **Fishes of the World.** Forth Edition.

NUNN GB, STANLEY SE 1998. **Body size effects and rates of cytochrome *b* evolution in tube-nosed seabirds.** Mol Biol Evol 15(10):1360– 1371

OLIVEIRA C, ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F. 2007. **Karyotypic evolution in Neotropical fishes.** In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F (eds) Fish cytogenetics. Science Publishers, Enfield, USA

OLIVEIRA C. & HILSDORF A.W.S. 2009. **Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations.** Fish Physiol Biochem 35: 81-100.

- OLIVEIRA C., AVELINO G.S., ABE K.T., MARIGUELA T.C., BENINE R.C., ORTI G., VARI R.P., CORREA-CASTRO R.M. 2011. **Phylogenetic relationship within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling.** BMC Evolutionary Biology 11:275.
- ORNELAS-GARCIA, C.P.; DOMINGUEZ-DOMINGUEZ, O. and DOADRIO, I. (2008). **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard(1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies.** BMC Evolutionary Biology, 8:340 doi:10.1186/1471-2148-8-340
- ORTI G. & MEYER A. 1997. **The radiation of the characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences.** Syst. Biol. 46: 75-100.
- PAGE RDM e HOLMES, EC (1998). **Molecular evolution. A phylogenetic approach.** Blackwell Science, UK.
- PAZZA, R., KAVALCO, K. F. & BERTOLLO, L. A. C. 2006. **Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms.** Cytogenetic and Genome Research 112, 313–319.
- PERDICES, A., BERMINGHAM, E., MONTILLA, A. e DOADRIO, I. (2002). **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** Mol. Phylogenet. Evol. 25: 172-189.
- PIE M.R.; BAGGIO R.A.; BOEGER W.A.; PATELLA L.A.; OSTRENSKY A.; VITULE J.R.S.; ABILHOA V. 2009. **Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguazu River.** Journal of Fish Biology, v. 75, p. 2357–2362.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L. and FORESTI, F. (1997). **Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabribinnis* paranae in a small stream.** Brazil. J. Genet. 20: 377-380
- POSADA, D. e CRANDALL, K.A. (1998). **Modeltest: testing the model of DNA substitution.** Bioinformatics, 14: 817-818.
- REIS, R.; KULLANDER S.O.; FERRARIS C.J. Jr. 2003. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.** EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- REIS R.E. 1989. **Systematic revision of the Neotropical characid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes).** Comun. Mus. Cie^{nc}. Tecnol. PUCRS, Se^{rie} Zool. 2, 3–86.
- ROSEN D.E. 1972. **Origin of the characid fish genus *Bramocharax* and a description of a second, more primitive, species in Guatemala.** Amer. Mus. Novitates 2500 1-21.
- SAMBROOK, J (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher.,
- SCHAEFER S.A. 1998. **Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae).** Pp. 375-400. *In*:

Malabarba, L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena M.S. e Lucena C.A.S. (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

SIMON C., FRATTI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H. & FLOOK P. 1994. **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers.** Ann. Entomol. Soc. Am. 87:651-701.

STRECKER, U., FAUNDEZ, V.H. e WILKENS, H. (2004). **Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data.** Mol. Phylogenet. Evol. 33, 469-481.

SUZUKI, F. M. & ORSI, M. L. 2008. **Schooling behavior of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) in the Congonhas River, Parana, Brazil.** Revista Brasileira de Zoologia 25, 566–569.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. e KUMAR, S. 2007. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution. 24,. 1596-1599.

TARJUELO, I., POSADA, D., CRANDALL, K.A., PASCUAL, M., TURON, X., 2001. **Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean.** Mar. Biol. 139, 455–462.

TAVARES, D.O. 2007. ***Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) do Sistema do Alto rio Paraná: taxonomia.** Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto (dissertação de mestrado).

UJ A. 1990. **Étude comparative de l'osteologie cranienne des poissons de la famille des Characidae et son importance phylogénétique.** Ph.D. Dissertation. Université de Genève.

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

VARI R.P. & MALABARBA L.R. 1998. **Neotropical Ichthyology: An Overview.** Pp. 1-11. In: Malabarba, L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena M.S. e Lucena C.A.S. (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

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

WATERS, J.M., WALLIS, G.P., 2000. **Across the Southern Alps by river capture? Freshwater fish phylogeography in South Island, New Zealand.** Molecular Ecology 9, 1577–1582.

WEITZMAN, S. H. & MALABARBA, L. R. 1999. **Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from eastern Brazil.** Ichthyol. Explor. Freshwaters, 10 (1): 1-43.

WEITZMAN, S. H. & L. R. MALABARBA. 1998. **Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes).** Pp. 161–170. In: L. R. Malabarba, R.

E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre. 603p.

WEITZMAN, S. H. & FINK W.L. 1983. **Relationship of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei: Characidae), with comments on the phylogeny of New World characiforms**. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 150: 339-395.

WEITZMAN, S.H. & FINK W.L. 1985. **Xenobryconin phylogeny and putative pheromone pumps in Glandulocaudinae fishes (Teleostei: Characidae)**. *Smith. Contr. Zool.* 421, 1–119.

WEITZMAN, S.H., MENEZES, N.A., 1998. **Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) with the description of a new genus, Chysobrycon**. In: Malabarba, L., Reis, R., Vari, R., Lucena, Z.M.S., Lucena, C. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 171–192.

WELLBORN, G.A., COTHRAN, R.D., 2007. **Niche diversity in crustacean cryptic species: complementarity in spatial distribution and predation risk**. *Oecologia* 154, 175–183.

WHEELER W. 1996. **Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics**. *Cladistics*. 12:1–9.

WHEELER W. 2003. **Implied alignment: a synapomorphy-based multiple-sequence alignment method and its use in cladogram search**. *Cladistics* 19:261-268.

WRIGHT, J.T., ZUCCARELLO, G.C., STEINBERG, P.D., 2000. **Genetic structure of the subtidal red alga *Delisea pulchra***. *Mar. Biol.* 136, 439–448.

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