

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ÍGOR DE CARVALHO DEPRÁ

Estudo molecular de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei:
Characidae) como provável complexo de espécies

Maringá
2013

ÍGOR DE CARVALHO DEPRÁ

Estudo molecular de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei: Characidae) como provável complexo de espécies

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Maria Alves Pinto Prioli

Co-Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

D424e Deprá, Igor de Carvalho
Estudo molecular de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei: Characidae) como provável complexo de espécies / Igor de Carvalho Deprá. -- Maringá, 2013.
38 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves Pinto Prioli.

Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2013.

1. *Astyanax altiparanae* - DNA barcodes. 2. DNA barcodes. 3. *Astyanax altiparanae* - D-loop. 4. D-loop. 5. Espécies crípticas. 6. *Astyanax altiparanae* - Genética de populações. 7. Marcadores genéticos de DNA mitocondrial. I. Prioli, Sônia Maria Alves Pinto, orient. II. Prioli, Alberto José, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. IV. Título.

CDD 23.ed. 597.48

AMMA-001789

FOLHA DE APROVAÇÃO

IGOR DE CARVALHO DEPRÁ

Estudo molecular de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000
(Teleostei: Characidae) como provável complexo de espécies

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a Sônia Maria Alves Pinto Prioli
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof^a. Dr^a. Léia Carolina Lucio
Centro Universitário de Maringá

Aprovada em: 5 de abril de 2013.

Local de defesa: Sala 205 - Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha
família

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa, Silvia Ohashi, minha companheira e meu apoio nas horas boas e nas difíceis;

À minha filha, Amélie Akemi Ohashi Deprá, por lembrar sempre que preciso fazer o melhor que posso;

Aos meus pais, sempre dispostos a dar bons conselhos e encorajar minhas escolhas, e meus irmãos Gabriel de Carvalho Deprá e Lucas de Carvalho Deprá, com quem posso contar;

À minha orientadora, Sônia Maria Alves Pinto Prioli, e co-orientador, Alberto José Prioli, pela paciência que tiveram nestes dois anos.

Novamente ao Gabriel e a todos os colegas de laboratório e demais pessoas que ajudaram a tornar este trabalho possível: Nédia de Castilhos Ghisi, Luciano Seraphim Gasques, Vívian Nunes Gomes, Isadora Janólio de Oliveira, Adriana Vieira de Miranda e Jéssica Cristina da Silva, equipe da Coleção Ictiológica do Nupélia, e a todos que colaboraram com o PELD;

Aos meus sogro e sogra, Hitoshi Ohashi e Rosemary Aparecida Ferreira de Almeida, meu cunhado Eduardo Osamu Ohashi e cunhada Cláudia Ohashi, pela grande ajuda;

À secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, Márcia Helena Leonel, por tornar tudo mais fácil;

Aos membros da banca, por ceder seu tempo e atenção a este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia comparada, à Capes e ao Nupélia pelo apoio;

À Universidade Estadual de Maringá pelos valiosos anos de formação.

Estudo molecular de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei: Characidae) como provável complexo de espécies

RESUMO

Na última década, dez novas espécies do gênero *Astyanax* Baird & Girard 1854 foram descritas, e várias outras foram descobertas recentemente. Na bacia do alto Rio Paraná, ocorre *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000, pertencente ao chamado grupo *bimaculatus*, que inclui espécies com padrão de coloração e morfologia semelhantes. Concomitantemente com o avanço do uso do DNA mitocondrial para diagnose de espécies, foram encontradas em *A. altiparanae* duas linhagens com alta divergência na região *D-loop*, provisoriamente denominadas AltoPR e AltoPR-D, em trabalhos anteriores. Esta evidência levou à hipótese de as duas linhagens não pertencerem à mesma espécie. Usando sequências do gene *cox1*, as distâncias genéticas entre elas foram calculadas seguindo o modelo evolutivo K2P com distribuição Γ (parâmetro 0,09). Sequências disponíveis no GenBank foram inclusas nas análises. Hipóteses filogenéticas foram geradas por máxima verossimilhança e máxima parcimônia. As distâncias internas médias dos grupos AltoPR e AltoPR-D foram, respectivamente 0,02 e 0,03, e a distância entre ambos foi 0,37. As sequências de indivíduos coletados na bacia do Rio Paraíba do Sul e depositadas no GenBank também se dividem em dois grupos, um dos quais pôde ser identificado como AltoPR. No entanto, o outro grupo apresentou uma distância intermediária quando confrontado com AltoPR-D, e merece uma investigação mais aprofundada. As outras espécies inclusas apresentaram maior distância e mostraram-se monofiléticas em ambos os métodos de reconstrução filogenética. Os resultados sugerem, portanto, que se trata de duas espécies, e que ambas não correspondem às outras espécies usadas neste trabalho.

Palavras-chave: *DNA barcodes*, *D-loop*, espécies crípticas.

Molecular study of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski 2000 (Teleostei: Characidae) as a probable species complex

ABSTRACT

In the last decade, ten species from the genus *Astyanax* Baird & Girard 1854 have been described, and several non-described ones have been reported recently. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000, occurring in the upper Paraná River basin, belongs to the *bimaculatus* group, which comprises a number of species with very similar color pattern and morphology, resulting in they being cryptic. Following the advances in species diagnosis using mitochondrial DNA data, highly divergent D-loop lineages have been found previously in *A. altiparanae*, which have been distinguished as AltoPR and AltoPR-D groups. This evidence suggests that individuals carrying these mitochondrial lineages do not belong to the same species. By using *cox1* gene sequences, genetic distances between them were calculated with Kimura-2-parameter (K2P) model gamma-distributed (parameter 0.09); sequences available at GenBank were included. Maximum likelihood and maximum parsimony phylogenetic analyses were conducted. Within-group mean distances for AltoPR and AltoPR-D were, respectively 0.02 and 0.03, and net mean distance between them was 0.34. The sequences from individuals collected in Paraíba do Sul River basin also form two groups with distances compatible to those of congeners, one of which was identified as AltoPR. Nonetheless, the other group showed an intermediate value when compared to AltoPR-D, and should be further investigated. The rest of the included species are less close to these and appeared monophyletic in both trees, with very high bootstrap values. The results point to a species *status* of both lineages, one of which is probably new.

Keywords: DNA barcodes, D-loop, cryptic species.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1.1. Introdução	1
1.2. Revisão Bibliográfica.....	2
1.2.1. Evidência de uma nova espécie de <i>Astyanax</i> na bacia do alto Rio Paraná.....	2
1.2.2. Espécies de <i>Astyanax</i> presentes na bacia do alto Rio Paraná.....	3
1.2.3. Espécies de <i>Astyanax</i> do grupo <i>bimaculatus</i> pertencentes a outras bacias	4
1.2.4. Espécies crípticas ou próximas e divergências nucleotídicas.....	5
1.3. Referências.....	7
CAPÍTULO 2	10
2.1. Dados moleculares corroboram a existência de duas espécies sob a denominação <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski 2000 (Teleostei: Characidae), na bacia do alto Rio Paraná.....	11
ANEXO	30

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução

No gênero *Astyanax* Baird & Girard 1854, encontra-se o complexo de espécies conhecido como *bimaculatus*, composto de espécies com o mesmo padrão de coloração que *A. bimaculatus* (Linnaeus 1758). Uma dessas espécies crípticas é *A. altiparanae* Garutti & Britski 2000, encontrada na bacia do alto Rio Paraná.

Evidências recentes de caráter molecular apontam que provavelmente *A. altiparanae* é também um complexo de duas espécies, que são encontradas simultaneamente. Na última década, grande quantidade de estudos com marcadores moleculares vêm refinando técnicas para diagnose de espécies. Nesse contexto, o uso de genes mitocondriais é usado com crescente eficácia.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Evidência de uma nova espécie de *Astyanax* na bacia do alto Rio Paraná

O gênero *Astyanax* Baird & Girard 1854, de acordo com o Catalog of Fishes, contém 141 espécies válidas, das quais 40 foram descritas nos últimos 10 anos (ESCHMEYER et al., atualizado em 14 de janeiro de 2013), e a existência de novas espécies a serem descritas já foi detectada (MARRETA, 2011; OLIVEIRA, 2011). Reconhece-se a existência do complexo de espécies denominado grupo *bimaculatus* (GARUTTI e BRITSKI, 2000), nome derivado da espécie *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus 1758). Um dos primeiros estudos a reconhecer diferenças marcantes entre subconjuntos de indivíduos deste grupo foi o de Eigenmann (1921), que os tratou como subespécies.

Anteriormente, considerava-se que *A. bimaculatus* abrangesse toda a América do Sul, com localidade tipo no Suriname. Duas revisões de Garutti (1995 e 1998) restringiram essa denominação a espécimes da região norte, excluindo-a das bacias dos Rios São Francisco, Paraná, baixo Paraná-Paraguai, Uruguai, Ribeira de Iguape, Paraíba do Sul e sistema da Laguna dos Patos. De acordo com o Catalog of Fishes (citado acima), cinco espécies que haviam sido descritas como subespécies de *A. bimaculatus* ou sinonimizadas com esta espécie foram validadas recentemente. Algo semelhante ocorreu com *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000, espécie que ocorre em toda a bacia do alto Rio Paraná, cujos exemplares eram, antes, identificados como *A. bimaculatus*, de acordo com os autores da descrição. Entre todas essas espécies, o padrão de coloração é muito similar: uma mancha escura horizontalmente ovalada e duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha escura no pedúnculo caudal, que se estende até a extremidade dos raios caudais medianos; mas são distinguíveis por contagens e medidas.

Além de a última década ter sido a de maior atividade em número de espécies descritas de *Astyanax*, foi nesse período que se deu um grande desenvolvimento no uso de sequências nucleotídicas, principalmente mitocondriais, no estudo da genética populacional, da evolução e, como consequência, da taxonomia. Nesse contexto, investigando sequências mitocondriais da região controle *D-loop* de *A. altiparanae*, Prioli et al. (2002) encontraram dois haplogrupos divergentes em numerosos pontos, um dos quais tem um segmento de 32 pares de bases (pb) a mais, que, recentemente, foram relatados também em espécimes presentes no Rio Iguazu (PIE et al. 2009).

Prioli et al. (2012) discutiram esta diferenciação molecular em comparação com outras espécies. No trecho da região *D-loop* cuja sequência foi obtida, 5,1% dos nucleotídeos são diagnósticos dos haplogrupos AltoPR e AltoPR-D, (em que D significa deleção, ou ausência de inserção); esta divergência, como eles apontam, é comparável ao que ocorre nas sequências homólogas de *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. fasciatum*, que não geram híbridos naturalmente (BIGNOTTO et al., 2009, *apud* PRIOLI et al., 2012) e *Cichla kelberi* e *C. piquiti* (OLIVEIRA et al., 2006, *apud* PIOLI et al., 2012), que apresentam, respectivamente, 5,3% e 10% de nucleotídeos utilizáveis para diagnose.

Esses resultados expõem a necessidade de investigar se a denominação *Astyanax altiparanae*, na forma como é usada hoje, refere-se, de fato, a duas espécies. Se essa hipótese fosse confirmada, seria necessário obter informações de outras espécies já descritas, antes de considerar a descoberta de uma espécie nova.

Nesse sentido, Soria (2004) e Prioli et al. (2012, citado acima) já avançaram, comparando sequências dessa mesma região mitocondrial de *A. altiparanae* e *A. asuncionensis* Géry 1972, uma espécie da bacia do Rio Paraguai e baixo Paraná. *A. asuncionensis* também pertence ao grupo *bimaculatus* e é de diagnose incerta quando comparada a *A. altiparanae*, em que também foi constatada a ocorrência de dois haplogrupos bastante dissemelhantes, porém ambos com a deleção de 32 pb. De acordo com eles, seus resultados parecem indicar que cada um desses quatro haplogrupos corresponde a uma espécie, ou seja, tanto *A. altiparanae* como *A. asuncionensis* deveriam ser bipartidas.

1.2.2. Espécies de *Astyanax* presentes na bacia do alto Rio Paraná

Atualmente, estão descritas oito espécies de *Astyanax* da bacia do alto Paraná, além de *A. altiparanae*: *A. biotae* Castro & Vari 2004, *A. bockmanni* Vari & Castro 2007, *A. fasciatus* (Cuvier 1819), *A. janeiroensis* Eigenmann 1908, *A. paranae* Eigenmann 1914, *A. paranahybae* Eigenmann 1911, *A. schubarti* Britski 1964 e *A. trierythropterus* Godoy 1970, todas claramente distintas por caracteres morfológicos (EIGENMANN, 1908; GODOY, 1970; CASTRO e VARI, 2004; VARI e CASTRO, 2007; MARRETA, 2011; OLIVEIRA, 2011). Vale dizer, *Astyanax altiparanae* é a única espécie do grupo *bimaculatus* reconhecida atualmente na bacia do alto Rio Paraná. Além disso, estas espécies e outras ainda por serem descritas, muitas delas proximamente relacionadas, pertencem a um clado que divergiu de *A. altiparanae* cerca de 14,15 Ma, de acordo com Marreta (2011). Esta autora seguiu a estimativa de Bermingham et al. (1997), que estabeleceram taxas de substituição de 1,3%/Ma e 1,2%/Ma para os genes da ATPase 6/8 e citocromo *b* (*cytb*), respectivamente. Os dados disponíveis levam à hipótese de que os dois grupos considerados neste trabalho sejam mais

próximos, tanto por serem aparentemente indistintos morfológicamente quanto porque sua divergência na região *D-loop* é próxima à encontrada em fenômenos de especiação recentes (PRIOLI et al., 2012).

Oliveira (2011), por sua vez, realizou um estudo com exemplares de *Astyanax* em uma ampla distribuição geográfica no estado do Paraná, e encontrou duas espécies novas na bacia do alto Rio Paraná, ambas claramente distintas de *A. altiparanae*. Essas informações levam a crer que nenhuma das espécies da bacia do alto Paraná descritas atualmente poderia ser erroneamente identificada como *A. altiparanae*.

1.2.3. Espécies de *Astyanax* do grupo *bimaculatus* pertencentes a outras bacias

Na bacia do Rio Paraguai e baixo Paraná, além de *A. asuncionensis*, ocorrem *A. abramis* (Jenyns 1842) e *A. paraguayensis* (Fowler 1918), espécies do grupo *bimaculatus sensu* Garutti e Britski (2000), que afirmam que estas espécies possuem um padrão listrado de cromatóforos, visível nos indivíduos adultos, e atingem comprimento menor que *A. altiparanae*.

Na bacia do Rio São Francisco, ocorre *A. lacustris*, cujos exemplares, assim como *A. asuncionensis*, possuem semelhanças com os de *A. altiparanae*, com alguma sobreposição de caracteres morfológicos. A presença desta espécie no alto Paraná não seria muito surpreendente, considerando que diversas espécies são compartilhadas pelas duas bacias. Sendo assim, esta espécie também teria alguma probabilidade de corresponder a uma das linhagens em questão no presente trabalho.

Outro fato que põe em dúvida a delimitação taxonômica de *A. altiparanae* é que, em trabalho publicado recentemente (PEREIRA et al., 2011), a identificação de espécies de *Astyanax* contrastou com análises de sequências do gene de citocromo *c* oxidase (*coxI*). Exemplares coletados no Rio Paraíba do Sul e identificados como *A. bimaculatus* apresentaram sequências do gene *coxI* mais similares a indivíduos identificados como *A. altiparanae* coletados na mesma amostragem do que com outros indivíduos inicialmente considerados pertencentes à mesma espécie. De acordo com Garutti e Britski (2000), a espécie *Astyanax bimaculatus, sensu* Linnaeus, se restringe a exemplares com um dente no maxilar e não existe na bacia do Paraíba do Sul. Por outro lado, sabendo que houve erro na diagnose de alguns desses espécimes, é possível conjecturar que ambas as espécies correspondem aos grupos AltoPR e AltoPR-D, o que é facilmente testável sobrepondo sequências de *D-loop* e *coxI*.

Carvalho et al. (2011) também identificaram uma espécie como *A. bimaculatus*, porém não encontraram divergência entre sequências de *coxI* de indivíduos desta espécie e *A.*

lacustris (que eles consideram como subespécie de *A. bimaculatus*). Esses fatos reforçam a dúvida acerca da diagnose das espécies mais próximas no grupo *bimaculatus*.

1.2.4. Espécies crípticas ou próximas e divergências nucleotídicas

Durante a última década, deu-se o desenvolvimento do projeto Consortium for the Barcodes of Life (CBoL), que tem como objetivo possibilitar o uso de sequências do gene mitocondrial *cox1* para identificação de espécies de animais, exceto Cnidaria. A origem desse projeto foi a proposta de Hebert et al. (2003), que encontraram uma divergência média de 11,3% em sequências de *cox1*, entre pares de espécies de mesmo gênero nesse Reino, e 9,6%, em gêneros de cordados.

A literatura hoje conta com uma grande quantidade de exemplos para comparação de divergências nucleotídicas, especialmente em *cox1*. Hubert et al. (2008) fornecem um dos primeiros estudos amplos no que se refere à diferenciação deste gene em peixes de água doce, analisando a ictiofauna do Canadá, assim como Carvalho et al. (2011) e Pereira et al. (2011), respectivamente nas bacias do Rio São Francisco e do Rio Paraíba do Sul. Em todos esses estudos, as distâncias genéticas intraespecíficas e intragenéricas encontradas variaram amplamente.

Com base em uma ampla variedade de sequências do gene *cytb*, Johns & Avise (1998), estimaram que cerca de 98% dos pares de espécies congêneres de peixes têm distâncias acima de 2% entre si, e cerca de 10%, entre 4 e 5%. Assim, a distância genética calculada com base em genes mitocondriais pode auxiliar na triagem de possíveis espécies crípticas.

Considerando que a distância genética observada pode ser resultado apenas de estrutura populacional, Hebert e colaboradores (2004) realizaram uma pesquisa em busca de um limite para a razão entre distância interespecífica e distância intraespecífica nas espécies norte-americanas de aves e observam que, para cerca de 90% das espécies, essa razão é maior ou igual a 10, embora lembrem que especiações ou hibridizações recentes podem produzir resultados abaixo desse valor.

Mallet et al. (2005), discutem que, em teoria, em espécies da região Neotropical, as distâncias genéticas intraespecíficas poderiam se aproximar às interespecíficas, porque os tamanhos populacionais das espécies neotropicais provavelmente se mantiveram mais constantes enquanto as espécies setentrionais sofreram extinções em massa causadas por períodos de glaciação, o que contribuiria para uma maior distância interespecífica pela

eliminação ao acaso de espécies irmãs das que sobreviveram, e menor diversidade intraespecífica causada por gargalos populacionais.

Gomes (2011) encontrou casos, na bacia do alto Paraná, em que pares de espécies consideradas válidas, de fato, apresentaram distâncias intraespecíficas mais próximas às interespecíficas, em cinco gêneros. Isso leva a crer que na presente questão um resultado semelhante seja bastante provável.

Este estudo teve por objetivo avaliar o *status* taxonômico dos grupos AltoPR e AltoPR-D, atualmente considerados pertencentes à espécie *A. altiparanae*, com base em sequências mitocondriais, entre si e em relação a outras espécies do gênero *Astyanax*, de modo a determinar se eles devem ser tratados como duas espécies diferentes e, em caso positivo, se ambas correspondem a espécies já descritas ou trata-se da descoberta de uma espécie nova.

1.3. Referências

- Bignotto, T.S.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Maniglia, T.C., et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, n. 69, p. 681-689, 2009.
- Bermingham, E.; McCafferty, S.S.; Martin, A.P. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: **Molecular Systematics of Fishes** (Kocher, T.; Stepien, C.A., eds.). Academic Press, San Diego, 113-128, 1997.
- Carvalho, D.C.; Oliveira, D.A.A.; Pompeu, P.S.; Leal C.G., et al. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, n. 22, p. 80-86, 2011.
- Castro, R.M.C.; Vari, R.P. *Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the Rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Proceedings of the Biological Society in Washington**, n. 117, p. 330-338, 2004.
- Eigenmann, C.H. Preliminary descriptions of new genera and species of tetragonopterid characins. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, n. 52, p. 93-106, 1908.
- Eigenmann, C.H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of comparative Zoology**, n. 43, p. 209-310, 1921.
- Eschmeyer, W.N. (ed). Catalog of Fishes. California Academy of Sciences (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 14 january 2013.
- Garutti, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae) com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. Tese de Livre-docência, IBILCE-Unesp. São José do Rio Preto, 1995.
- Garutti, V. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**, n. 85, p. 115-122, 1998.
- Garutti, V.; Britski, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoológica**, n. 13, p. 65-88, 2000.
- Godoy, M.P. Nova espécie de *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Pisces, Characidae, Heterognathi). **Revista Brasileira de Biologia**, n. 30, p. 275-279, 1970.
- Gomes, V.N. **Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na identificação de espécies de peixes neotropicais**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

- Hebert, P.D.N.; Ratnasingham S.; Waard J.R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergence among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London, B: Biological Sciences**, (Supl.) n. 270, p. S96–S99, 2003.
- Hebert, P.D.N.; Stoeckle M.Y.; Zemplak T.S.; Francis C.M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS ONE**, n. 2, p. 1657-1663, 2004.
- Hubert, N.; Hanner, R.; Holm, E., Mandrak, N.E., et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**, n. 3, e2490, 2008.
- Johns, G.C.; Avise, J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. **Molecular Biology and Evolution**, n. 15, p. 1481-1490, 1998.
- Mallet, J.; Isaac, N.J.B.; Mace, G.M. Response to Harris and Froufe, and Knapp et al.: Taxonomic inflation. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 20, p. 8-9, 2005.
- Marreta, M.A. **Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 2011.
- Oliveira, A.V.; Prioli, A.J.; Prioli S.M.A.P.; Bignotto, T.S., et al. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **Journal of Fish Biology**, n. 69, p. 260–277, 2006.
- Oliveira, C.A.M. **Estudo taxonômico de *Astyanax* Baird & Girard, 1854 e *Deuterodon Eigenmann*, 1907 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas do Estado do Paraná**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- Pereira, L.H.G.; Maia, G.M.G.; Hanner, R.; Foresti, F.; et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, n. 22, p. 71–79, 2011.
- Pie, M.R.; Baggio, R.A.; Boeger, W.A.; Patella, L.A., et al. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguazu River. **Journal of Fish Biology**, n. 75, p. 2357-2362, 2009.
- Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Julio, H.F. Jr.; Pavanelli, C.S., et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, n. 25, p. 421-430, 2002.
- Prioli, A.J.; Carlo, V.A.; Soria, T.V.; Prioli, S.M.A.P., et al. Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. **Genetics and Molecular Research**, n. 11, p. 1064-1074, 2012.
- Soria, T.V. **Diversidade em seqüências da região controle do DNA mitocondrial de populações de *Astyanax* da bacia do alto Rio Paraná**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G., et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, n. 28, p. 2731-2739, 2011.
- Thompson, J.; Higgins, D.; Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- Vari, R.P.; Castro, R.M.C. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper Rio Parana´ system, Brazil. **Copeia**, n. 2007, p. 150-172, n. 2007.

CAPÍTULO 2

Dados moleculares corroboram a existência de duas espécies sob a denominação *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei: Characidae), na bacia do alto Rio Paraná

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Genetics and Molecular Research*.

INTRODUÇÃO

Astyanax altiparanae Garutti & Britski 2000 é uma das espécies mais abundantes da bacia do alto Rio Paraná. Pertence a um complexo de espécies denominado grupo *bimaculatus*, por apresentar características morfológicas altamente semelhantes e mesma coloração que *A. bimaculatus* (Garutti e Britski, 2000). A esse complexo de espécies pertence também *A. asuncionensis*, que ocorre na bacia do rio Paraguai e baixo Paraná, dificilmente distinguível de *A. altiparanae*.

Prioli et al. (2002) encontraram evidência, baseados em sequências de *D-loop* de espécimes identificados como *A. altiparanae*, de que eles podem pertencer a espécies distintas, posto que há uma variação relativamente grande entre os dois grupos de haplótipos encontrados, denominados por eles AltoPR e AltoPR-D. Esse fato levou à hipótese de que um desses haplogrupos pertencesse a *A. asuncionensis* que tivessem invadido o alto Paraná, porém além de esta hipótese não ter sido confirmada, foi encontrada uma divergência semelhante entre dois haplótipos de *A. asuncionensis* (Soria, 2004).

Essa evidência poderia ser explicada por uma entre três situações: na primeira, esta diferenciação profunda seria apenas produto da diversidade intraespecífica; na segunda, um dos haplogrupos de *A. altiparanae* seria derivado de outra espécie próxima por introgressão; e na terceira, ambos os haplogrupos seriam pertencentes a espécies diferentes. Neste último caso, caberia determinar se uma das espécies já foi descrita ou se trata de uma nova espécie.

Embora o uso da região *D-loop* não seja amplamente disseminado, há diversos estudos baseados em DNA mitocondrial que discutem a diferenciação entre espécies congêneres. O gene *cox1* (Hebert et al., 2003) é a região mitocondrial mais usada para diagnose de espécies próximas, com o advento do Consortium for the Barcodes of Life. Trabalhos baseados em *cox1* documentam graus de diferenciação em diversos grupos animais, incluindo a ictiofauna de algumas bacias brasileiras (Hubert et al. 2008; Carvalho et al., 2011; Pereira et al., 2011). Hebert et al. (2004), considerando que distâncias genéticas extremamente pequenas podem ser observadas em especiações recentes, propõem uma razão mínima empírica entre as distâncias genéticas médias intraespecíficas e a distância interespecífica como ferramenta para revelar espécies crípticas.

Este estudo usou sequências mitocondriais do gene *cox1* de indivíduos coletados na bacia do alto Rio Paraná, identificados como *A. altiparanae* e genotipados pela região *D-loop* como AltoPR e AltoPR-D, comparadas a sequências de outras espécies do grupo *bimaculatus* encontradas no GenBank, para testar as hipóteses acima.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de DNA

Os exemplares de *A. altiparanae* foram coletados nas seguintes localidades da bacia do alto Rio Paraná (Figura 1): 1) Porto Rico (alto Rio Paraná), 2) Rio do Campo (município de Campo Mourão - PR, a montante e a jusante da cidade) e 3) Córrego Soares (município de S. Miguel Arcanjo – SP), afluente do Rio Itapetininga. Os espécimes foram preservados injetando-se álcool comercial em suas cavidades abdominais, no qual também foram submersos, e foram depositados na Coleção Ictiológica do Nupélia (alguns ainda não estão cadastrados, ver Tabela 1). Para extração de DNA, foi seguida a técnica com fenol e clorofórmio usada por Prioli et al. (2012).

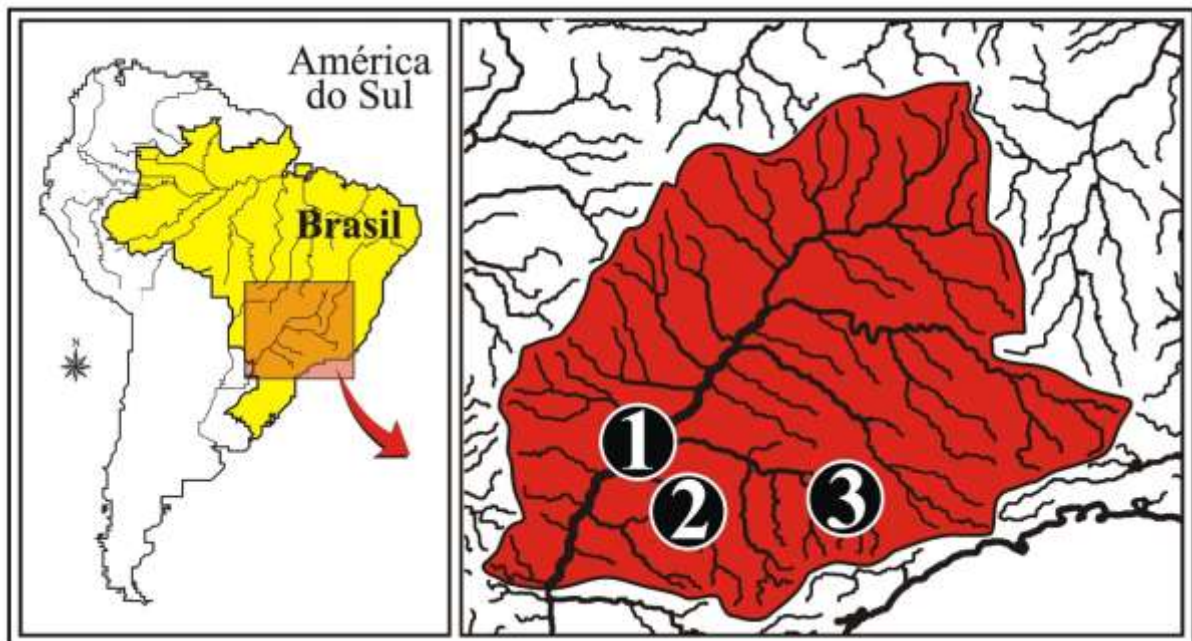


Figura 1. Pontos de coleta dos exemplares de *A. altiparanae*. 1) Base avançada do Nupélia, alto Rio Paraná, Município de Porto Rico, PR (22°40'S/53°14'O), 2) Rio do Campo, Município de Campo Mourão, PR (23°59'S e 52°20'O) e 3) Córrego Soares, tributário do Rio Itapetininga, Município de São Miguel Arcanjo, SP (23°46'S/47°43'O). Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

PCR e sequenciamento

A reação para amplificação da região *D-loop* e do gene *cox1* usou as seguintes concentrações finais, para 25µL de reação: tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, cada dNTP a 400 µM, 160 nM de cada *primer*, 1,25 IU de *Platinum Taq polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 20 ng de DNA genômico. Para a região *D-loop*, foram usados os *primers* L15774M (5' CAACATGAATTGGAGGTATAACAGT 3') e H16498 (5'

CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'), de acordo com Prioli et al (2002); o programa usado foi: 3min45s 94°C/41×(15s 94°C/30s 60°C/2min 72°C)/8min 72°C, de acordo com Pie et al. (2009), e obteve-se um produto de aproximadamente 700 pb, observado em gel de agarose marcado com brometo de etídeo. O gene *cox1* foi amplificado com os *primers* H7152 (5' CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA 3') e L6448-F1 (5' TCAACCAACCACAAAGACATTCGGCAC 3'), e 2min 94°C/35×(30s 94°C/40s 52°C/1min30s 72°C)/10min 72°C; o comprimento dos fragmentos obtidos foi cerca de 700 pb. Para purificação de cada produto de PCR, foram usados 25 µL de polietilenoglicol (PEG) 8000 20% (m/v), para obter uma concentração final de 10% para precipitação do DNA e lavagem com etanol gelado a uma concentração final de ~57%.

Tabela 1 - Espécimes de *Astyanax altiparanae* usados para análise do gene *cox1* e região *D-loop*. O número do PELD corresponderá ao número dos exemplares na Coleção Ictiológica (NC: ainda não cadastrados).

Exemplar	Nº. PELD	Exemplar	Nº. PELD
		<i>Porto Rico</i>	
		Asty-PR-11	156077
Asty-PR-01	147274	Asty-PR-12	156081
Asty-PR-02	147896	<i>Rio do Campo</i>	
Asty-PR-03	147897	Asty-PR-13	NC
Asty-PR-04	147916	Asty-PR-14	NC
Asty-PR-05	146920	Asty-PR-15	NC
Asty-PR-06	148696	<i>Córrego soares</i>	
Asty-PR-07	148853	Asty-PR-16	NC
Asty-PR-08	154792	Asty-PR-17	NC
Asty-PR-09	155990	Asty-PR-18	NC
Asty-PR-10	156076	Asty-PR-19	NC

Fonte: elaborado pelo autor, 2013

Ambas as fitas de DNA foram utilizadas para obtenção de sequências da maioria das amostras. A reação de sequenciamento consistiu em 35 ciclos de 30s 94 °C/ 40s para anelamento/ 1min30s 60°C com a última etapa de extensão prolongada em 5min. A temperatura de anelamento foi de 57°C para *D-loop* e 52°C para *cox1*. Os produtos foram purificados com acetato de amônio a uma concentração final de 750 mM e etanol a uma

concentração final de 70%, centrifugando a 12,000 RPM por 20min, com uma lavagem adicional com etanol 70%.

As sequências de DNA foram obtidas usando o equipamento MegaBACE (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), editadas e analisadas usando o programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Apenas sequências com mais de 400 pb foram utilizadas para *D-loop* e 500 pb para *cox1*. As sequências que apresentaram pontos duvidosos foram descartadas, e as análises foram feitas com base nas sequências de *D-loop* e *cox1* independentemente.

Cálculo das distâncias genéticas e reconstrução filogenética

As sequências de *cox1* editadas foram posteriormente submetidas ao BLAST, usando o algoritmo *megablast*, para comparação com exemplares coletados em outras localidades, e foram aproveitadas as sequências que apresentaram identidade acima de 94%. Sequências de *D-loop* usadas por Prioli et al. (2012) foram também inclusas. Foi estimado o melhor modelo evolutivo para calcular distâncias com base em cada região mitocondrial, pelo *Bayesian Information Criterion* (BIC) e *Akaike Information Criterion, corrected* (AICc). Para cada região sequenciada, foram obtidas hipóteses filogenéticas por máxima verossimilhança (MV) e máxima parcimônia (MP) para a região *D-loop*, também usando o programa MEGA 5.05. Os cladogramas obtidos por MV foram testados com 1000 reamostragens de *bootstrap*, e o que foi obtido por MP, com 5000 reamostragens. A filogenia com base em *cox1* incluiu como grupos externos espécies de *Astyanax* sabidamente distantes, cujas sequências foram obtidas no GenBank. Foi feita também uma análise filogenética de *cox1* sem grupos externos, com 10000 reamostragens de *bootstrap*.

RESULTADOS

Foram obtidas 18 sequências da região *D-loop* com mínimo de 448 bases, e foram encontrados 66 nucleotídeos variáveis entre os indivíduos coletados para este estudo (Tabela 2, p. 19). Estas sequências apresentaram os dois haplogrupos já relatados por Prioli et al. (2002), com um evento de inserção ou deleção de 35 pb. Embora Prioli et al. (2002) tenham relatado uma *indel* de 32 pb, a diferença parece ser causada por uma variação no alinhamento das sequências. Um fato a ser notado foi a presença de um exemplar (Asty-PR-04) cujas sequências contêm o fragmento de 35 pb, embora tenha se originado, sem dúvida, da linhagem em que esse fragmento está ausente. De *cox1*, Obtiveram-se 8 sequências desses mesmos indivíduos e uma extra que foi identificada como pertencente ao grupo AltoPR-D em comparação com outras sequências deste gene. Para as análises, foram usadas 523 bases, em que foram encontrados 18 sítios variáveis considerando apenas *A. altiaparanae* e 44 considerando indivíduos identificados como *A. abramis*, *A. bimaculatus* e *A. lacustris* (Tabela 3, p. 21).

A busca no BLAST por sequências homólogas de *cox1* retornou os indivíduos coletados nas bacias do Rio São Francisco por Carvalho et al. (2011), identificados como *A. bimaculatus* e *A. lacustris* e do Rio Paraíba do Sul por Pereira et al. (2011), identificados como *A. bimaculatus* e *A. altiaparanae*, e exemplares da bacia do alto Rio Paraná identificados como *A. abramis*, como os de maior similaridade. Não há sequências depositadas de outras espécies do grupo *bimaculatus*, e as demais espécies descritas no gênero e encontradas em outras bacias são inequivocamente diagnosticáveis.

O modelo escolhido usando o AICc e o BIC para a região *D-loop* foi Tamura 3 Parâmetros (T92), com distribuição Γ (parâmetro 0,60). As distâncias médias entre indivíduos de cada linhagem foram 1,2% para AltoPR e 1,8% para AltoPR-D, e 7,5% entre ambas. As reconstruções filogenéticas foram compatíveis com a separação baseada na deleção/inserção, exceto para Asty-PR-04, como dito anteriormente (Figuras 2 e 3). No entanto, a observação da distância genética entre este e os indivíduos de cada grupo deixa claro que deve ter havido uma inserção recente na linhagem ancestral deste indivíduo. Pode ser observado que esta inserção é parte de uma série de três repetições adjacentes, e apenas uma delas apresenta uma substituição (ver Figura 4). Essas repetições ocorrem em todos os indivíduos, sendo tipicamente duas no grupo AltoPR-D e três em AltoPR, mas nos pertencentes ao grupo AltoPR as sequências repetidas em geral sofreram mais substituições (não mostrado). Outro fato a ser observado é que o espécime Asty-PR-19, na árvore de MP, ficou à parte dos demais,

enquanto a análise de MV o deixou no clado AltoPR-D, porém com valor de *bootstrap* menor que 70%.

Tabela 2 – Posições polimórficas nas sequências de *D-loop* obtidas neste estudo.

Grupo	Espécime	Posição																																			
		4	7	1	2	3	4	5	6	7	8	8	9	9	9	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
	Asty-PR-01	T	G	G	C	T	T	A	A	A	A	C	A	C	T	A	G	A	T	T	C	A	A	T	G	G	A	A	A	G	T	C	A	G	A		
	Asty-PR-01 (L)
	Asty-PR-13(L)	T	A	C	.	.	.	G	.	
	Asty-PR-14	T	A	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	
AltoPR	Asty-PR-14 (L)	T	A	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	
	Asty-PR-15	T	A	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	
	Asty-PR-15 (L)	T	A	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	
	Asty-PR-08	T	A	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	
	Asty-PR-10	G	T	G	
	Asty-PR-02	A	A	A	.	A	C	.	T	.	T	G	T	C	.	A	T	.	C	T	T	.	A	.	.	.	
	Asty-PR-02 (L)	A	A	A	.	A	C	.	T	.	T	G	T	C	.	A	T	.	C	T	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-03	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	.	C	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-03 (L)	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	.	C	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-04	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	A	A	G	.	T	A	.	T	G	A	.	.	
	Asty-PR-04 (L)	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	A	A	G	.	T	A	.	T	G	A	.	.	
	Asty-PR-05	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	G	C	T	G	A	G	.	.
	Asty-PR-05 (L)	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	G	C	T	G	A	G	.	.
AltoPR-D	Asty-PR-06	A	A	A	.	A	.	.	.	G	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-06 (L)	A	A	A	.	A	.	.	.	G	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-07	A	A	A	.	A	T	G	-	.	.	A	T	.	C	T	G	T	T	G	A	.	.	.
	Asty-PR-07 (L)	A	A	A	.	A	T	G	-	.	.	A	T	.	C	T	G	T	T	G	A	.	.	.
	Asty-PR-09	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	.	C	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-11	A	A	A	T	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	T	.	A	G	.	.	.
	Asty-PR-12	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	.	C	T	.	G	C	T	G	A	.	.	.
	Asty-PR-17	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	C	C	T	T	.	A	.	.	.
	Asty-PR-18	A	A	A	.	A	T	G	T	.	.	A	T	C	C	T	.	.	C	T	G	A
	Asty-PR-19	A	A	A	.	A	T	.	T	.	.	A	T	.	C	T	T	.	A

Tabela 2 (continuação)

Grupo	Espécime	Posição																																			
		2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4						
		5	6	6	8	9	9	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	5	5	5	6	7	7	8	9	9	0	0	1	1	2	2	3	4			
		6	5	6	0	2	6	2	6	9	0	1	7	1	5	8	9	0	2	3	0	1	7	5	0	1	2	3	1	3	1	8	0	7			
AltoPR	Asty-PR-01	-	G	T	A	G	T	T	C	C	C	C	A	T	A	A	C	T	A	T	A	T	T	C	C	C	T	A	A	A	A	C	C				
	Asty-PR-01 (L)	-		
	Asty-PR-13(L)	-	A	.	G	T	.	G	C	G	.	.	.		
	Asty-PR-14	-	A	.	G	T	.	G	.	.	G	C		
	Asty-PR-14 (L)	-	A	.	G	T	.	G	.	.	G	C		
	Asty-PR-15	-	A	.	G	T	.	G	C		
	Asty-PR-15 (L)	-	A	.	G	T	.	G	C		
	Asty-PR-08	-	A	.	G	T	.	G		
	Asty-PR-10	-	T	.	G	G		
	AltoPR-D	Asty-PR-02	T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	C	.	.	A	.	.	T	.	C		
Asty-PR-02 (L)		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	C	.	.	A	.	.	T	.	C			
Asty-PR-03		C	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	.	.	.	T	C	.	.	A	C		
Asty-PR-03 (L)		C	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	.	.	.	T	C	.	.	A	C		
Asty-PR-04		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	.	T	C	.	.	A	.	T	.	C		
Asty-PR-04 (L)		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	.	T	C	.	.	A	.	T	.	C		
Asty-PR-05		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	.	T	C	.	.	A	.	.	.	C	T	.	
Asty-PR-05 (L)		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	.	T	C	.	.	A	.	.	.	C	T	.	
Asty-PR-06		T	A	C	.	A	C	G	T	T	T	T	.	C	T	C	.	.	A	.	.	.	C	
Asty-PR-06 (L)		T	A	C	.	A	C	G	T	T	T	T	.	C	G	.	.	.	T	C	.	.	A	.	.	.	C	.	G	
Asty-PR-07		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	T	C	.	C	A	.	.	.	C	
Asty-PR-07 (L)		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	T	C	G	C	A	.	.	.	C	
Asty-PR-09		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	C	.	.	A	.	.	.	C	T	.	.	
Asty-PR-11		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	T	C	.	.	A	.	.	.	C	
Asty-PR-12		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	.	T	C	.	.	A	.	.	.	C	
Asty-PR-17		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	T	C	.	.	A	C	.	.	T	C	
Asty-PR-18		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	.	.	C	.	.	.	A	T	C	.	.	A	C	.	.	T	C	
Asty-PR-19		T	A	C	.	A	.	G	T	T	T	T	C	.	.	A	.	.	.	C	.	.	C

Fonte: elaborado pelo autor, 2013

Tabela 3 – Posições polimórficas no gene *CoxI* dos indivíduos inclusos neste estudo. Os espécimes cujas sequências foram obtidas do GenBank são identificados pelos seus números nas respectivas coleções. Abreviações: APR e APR-D, grupos AltoPR e AltoPR-D, respectivamente; Aab, *A. abramis*, *A. bimaculatus*; , *A. lacustris*.

Grupo	Espécime	Posição																																																		
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5			
		4	7	9	9	9	0	1	1	3	3	3	3	4	5	7	7	9	1	3	5	5	8	9	9	9	1	1	1	5	6	7	7	8	1	2	2	5	6	8	9	9	0	1								
		4	0	0	1	2	7	9	2	5	0	3	6	9	5	1	0	5	0	1	8	0	9	9	2	5	8	0	3	6	2	4	0	7	8	2	4	8	1	0	8	3	6	2	4							
APR	Asty-PR-08	G	A	C	C	C	T	T	T	T	A	T	A	A	G	G	A	G	T	A	A	C	C	G	A	A	A	C	C	C	A	T	T	C	T	T	A	G	T	C	T	A	G	A	T							
	Asty-PR-10	A				
	Asty-PR-13			
	Asty-PR-15			
APR-D	Asty-PR-04	.	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	T	T	.	G	C	.	A	C	.	.	G	A	.	.						
	Asty-PR-09	.	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	G	A	A	T	T	.	G	C	.	A	C	.	.	G	A	.	.						
	Asty-PR-16	.	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	G	A	A	T	T	.	G	C	.	A	C	.	.	G	A	.	.						
	Asty-PR-17	.	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	G	A	A	T	.	.	.	G	T	.	G	C	.	A	C	.	.	G	A	.	.						
	Asty-PR-18	.	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	G	A	A	T	.	.	.	G	T	.	G	C	.	A	C	.	.	G	A	.	.						
PS1	LBP-29348	G			
	LBP-29347	
	LBP-29346	
	LBP-29345
	LBP-29344
	LBP-29126
PS2	LBP-29127	.	G	.	T	.	A	.	C	C	.	C	G	.	A	A	T	.	.	.	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	A	.	.	C	.	A	G	.								
	LBP-29093	.	G	.	T	.	A	.	C	C	.	C	G	.	A	A	T	.	.	.	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	A	.	.	C	.	A	G	.								
SF	DCC4184(2)	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C								
	DCC4184	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C								
	DCC4181	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C								
	DCC4288	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C								
	DCC41888	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C									
	DCC41887	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C									
	DCC41852	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C									
	DCC41851	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C									
	DCC41834	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C								
	DCC38287	A	.	T	T	.	A	.	C	.	.	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	C	A	.	.	C	.	A	.	T	.	.	A	G	C									
	DCC38286	A	.	.	T	.	A	.	C	.	.	C	G	.	A	A	.	A	.	.	T	T	T	A	A	.	.	C	.	A	A	G	C									

Tabela 3 (continuação)

	DCC38285	A . . T . A . C . . C G . A A . A . . T T T A A . . C . A A G C
SF	DCC38284	A . . T . A . C . . C G . A A . A . . T T T A A . . C G A A G C
	DCC01052	A . . T . A . C . . C G . A A . A . . T T T A C A . . C . A . T . . A G C
	HRCB:28297	. G . . T A C C . G C . . A A . . C G T G T A T C C . A C . . G A . .
Aab	HRCB:28296	. G . . T A C C . G C . . A A . . C G T G T A T C C . A C . . G A . .
	HRCB:26167	. G . . T A C C . G C . . A A . . C G T G T A T C C . A C . . G A . .
	HRCB:26166	. G . . T A C C . G C . . A A . . C G T G T A T C C . A C . . G A . .

Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

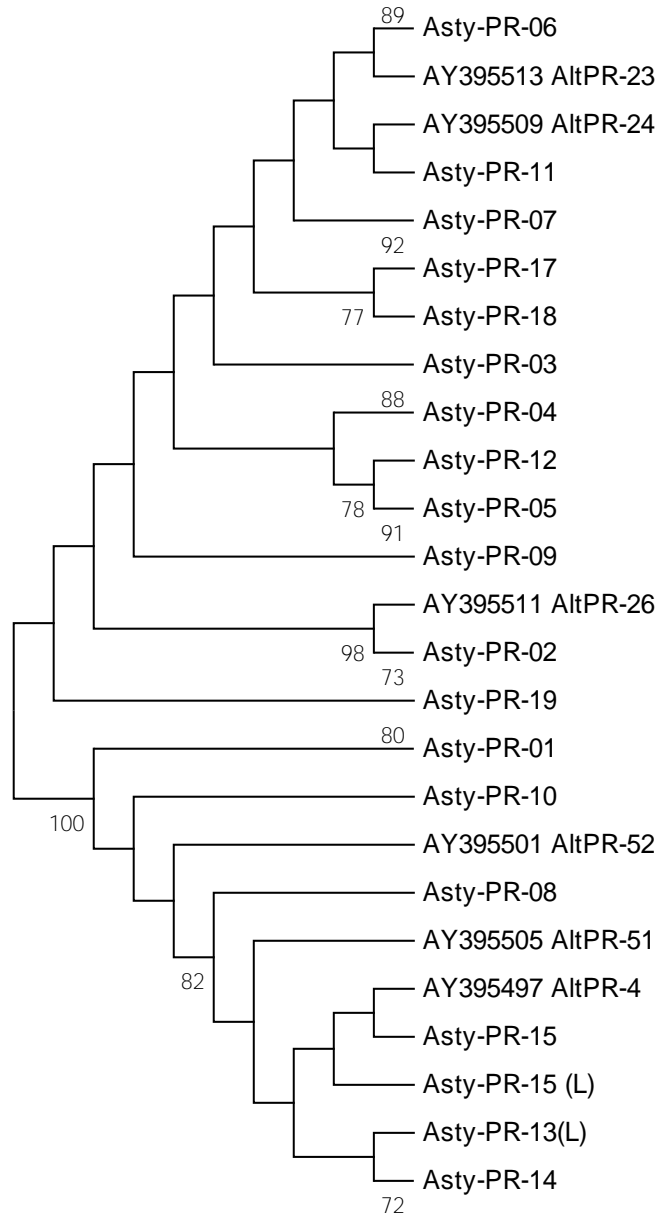


Figura 2. Filogenia estimada por máxima verossimilhança a partir da região *D-loop* de *A. altiparanae*, em que são encontradas as linhagens AltoPR e AltoPR-D, que aparecem como monofiléticas. Foi usado o modelo T92, com distribuição Γ (parâmetro 0,60), e 1000 reamostragens de *bootstrap*, incluindo indivíduos depositados no GenBank por Prioli et al. (2012). Em casos em que foram usadas ambas as fitas mitocondriais, elas foram colapsadas. Valores de *bootstrap* abaixo de 70% foram omitidos. Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

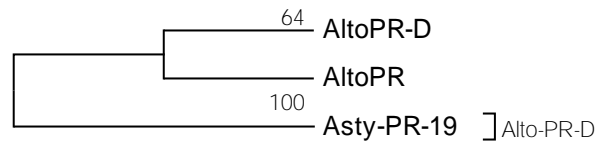


Figura 3. Filogenia estimada por máxima parcimônia a partir da região *D-loop* de *A. altiparanae*, em que são encontradas as linhagens AltoPR e AltoPR-D, que aparecem como monofiléticas. Foram feitas 100 reamostragens de *bootstrap*, incluindo indivíduos depositados no GenBank por Prioli et al. (2012). As linhagens concordam com a filogenia da Figura 2 e estão colapsadas para melhor visualização. Deve-se notar, no entanto, a exceção Asty-PR-19. Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

5' GTACATAATATGTATAATTATACATATATGTACTA
 GTACATAATATGTATAATTATACATATATGTACTA
 GTACATAATATGTATAATTG**G**TACATATATGTACTA 3'

Figura 4. Trecho da sequência de *D-loop* de Asty-PR-04 (bases 126 a 230), mostrando que a inserção/deleção que ocorre nessa região é uma repetição em *tandem*. A única base que difere aparece destacada. Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

Para *cox1*, o modelo evolutivo dependeu da inclusão do grupo externo, formado por *A. eigenmanniorum*, *A. fasciatus*, *A. intermedius* e *A. parahybae*, e os mesmos modelos foram usados para cálculo de distâncias genéticas e reconstrução filogenética por MV. Sem o grupo externo, foi escolhido o modelo Kimura 2 Parâmetros (K2P) com distribuição gama de parâmetro 0,09. Em relação às distâncias entre os indivíduos, agrupados por localidade, todas as populações mostraram-se coesas, exceto os indivíduos da bacia do Rio Paraíba do Sul, que foram então divididos em dois grupos, de acordo com a proximidade entre os indivíduos. Os grupos das bacias dos Rios Paraíba do Sul e São Francisco foram designados como PS (dividido em PS1 e PS2), e SF, respectivamente. As distâncias internas médias dos grupos AltoPR e AltoPR-D foram, respectivamente, 0,2% e 0,3%, e entre eles, 3,7%. Na Tabela 4 estão as distâncias genéticas incluindo os grupos formados por sequências do GenBank, mostrando a correspondência entre AltoPR e o grupo aqui denominado PS1. Surpreendentemente, os grupos AltoPR-D e PS2 mostraram uma distância relativamente alta.

Tabela 4 – Distâncias genéticas dentro e entre grupos, calculadas usando o gene *cox1* e o modelo evolutivo K2P, com distribuição Γ (parâmetro 0,09).

	AltoPR	AltoPR-D	PS1*	PS2*	SF*	Aab*
AltoPR	0,002					
AltoPR-D	0,037	0,003				
PS1*	0,001	0,040	0,001			
PS2*	0,050	0,026	0,053	0,000		
SF*	0,054	0,037	0,058	0,033	0,003	
Aab*	0,076	0,053	0,079	0,057	0,085	0,000

*PS1 e PS2 referem-se a exemplares da bacia do Rio Paraíba do Sul depositados no GenBank por Pereira et al. (2011), e SF refere-se a indivíduos da bacia do Rio São Francisco depositados por Carvalho et al. (2011). *A. abramis* está abreviado. Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

Quando incluso o grupo externo, o modelo escolhido foi T92, com distribuição Γ e parâmetro 0,16. No entanto, as distâncias calculadas não apresentaram grandes diferenças. As distâncias internas de AltoPR e AltoPR-D foram, respectivamente, 0,1% e 0,3%, enquanto entre ambos foi 3,5%. A distância entre AltoPR-D e PS2 foi 2,3%, muito similar àquela calculada com o modelo K2P.

Os resultados das análises filogenéticas realizadas com base em *cox1* são mostrados nas Figuras 5 e 6. A inclusão do grupo externo e o modelo escolhido tiveram influência sobre as hipóteses obtidas, porém todos os grupos formaram clados monofiléticos fortemente suportados.

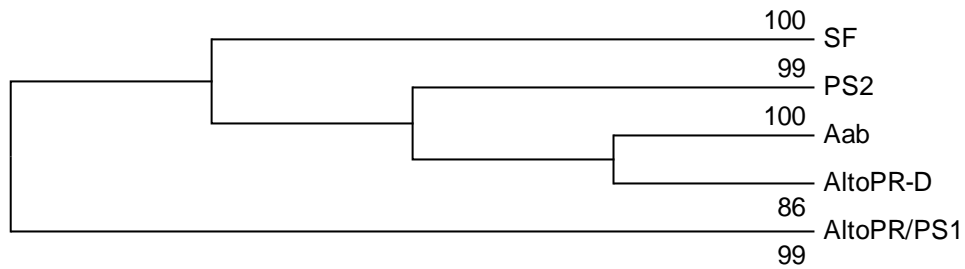


Figura 5. Filogenia inferida por máxima verossimilhança a partir do gene *cox1* de *A. altiparanae*, em que são encontradas as linhagens AltoPR e AltoPR-D, e sequências obtidas do GenBank identificadas como *A. abramis*, *A. bimaculatus* e *A. lacustris*. Foi usado o modelo K2P, com distribuição Γ (parâmetro 0,09), com 10000 reamostragens de *bootstrap*. Os grupos, previamente estabelecidos com base nos locais de coleta, que se mostraram monofiléticos foram colapsados para melhor visualização. Valores de bootstrap abaixo de 70% foram omitidos. Legenda: Aab refere-se a indivíduos identificados com *A. abramis*, cujas sequências estão depositadas no GenBank, PS1 e PS2 referem-se aos indivíduos coletados na bacia do Rio Paraíba do Sul por Carvalho et al. (2011) e SF refere-se aos indivíduos coletados por Pereira et al. (2011). Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

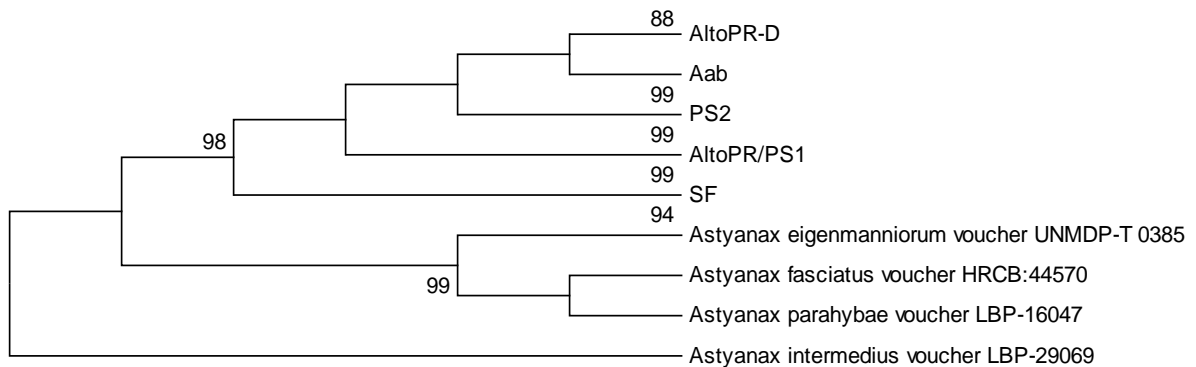


Figura 6. Filogenia inferida por máxima verossimilhança a partir do gene *cox1* de *A. altiparanae*, em que são encontradas as linhagens AltoPR e AltoPR-D, e sequências obtidas do GenBank identificadas como *A. abramis*, *A. bimaculatus* e *A. lacustris*. Foi usado o modelo T92, com distribuição Γ (parâmetro 0,17), com 1000 reamostragens de *bootstrap*. Os grupos, previamente estabelecidos com base nos locais de coleta, que se mostraram monofiléticos foram colapsados para melhor visualização. Indivíduos identificados como pertencentes a outras espécies estão acompanhados por seus números do GenBank. Valores de bootstrap abaixo de 70% foram omitidos. Legenda: Aab refere-se a indivíduos identificados com *A. abramis*, cujas sequências estão depositadas no GenBank, PS1 e PS2 referem-se aos indivíduos coletados na bacia do Rio Paraíba do Sul por Carvalho et al. (2011) e SF refere-se aos indivíduos coletados por Pereira et al. (2011). Fonte: elaborado pelo autor, 2013.

DISCUSSÃO

A sequência da região *D-loop* do indivíduo Asty-PR-04, coletado na planície de inundação do alto Rio Paraná, com 35 pb a mais que as demais do grupo AltoPR-D, mostra que este fenômeno *indel* não é determinante da divisão entre os grupos. O fato de que o fragmento que falta na maioria dos indivíduos deste grupo tem apenas uma ligeira variação em relação ao trecho adjacente e que em Asty-PR-04 ocorre uma repetição em *tandem* que ainda não sofreu substituições de bases, leva a crer que algum mecanismo produz a duplicação dessa sequência esporadicamente.

As sequências do gene *cox1* obtidas dentro e entre as linhagens AltoPR e AltoPR-D confirmam que a distância entre ambas é mais de 10 vezes maior que a distância média entre os indivíduos de cada uma, e esta razão está próxima ao que Hebert et al. (2004) encontraram em aves; portanto há reforçada evidência em favor da hipótese de que ambas são espécies distintas. Em relação à região *D-loop*, essa regra não parece ser aplicável, já que a razão das distâncias entre linhagens e as médias internas se mostrou bastante abaixo de 10. A explicação pode ser a taxa mais rápida de mutação nesta região, considerando que uma grande proporção desta região não codificante é neutra; ainda assim, a diferenciação entre grupos assemelha-se à encontrada por Bignotto et al. (2009, apud Prioli et al., 2012) e Oliveira et al. (2006, apud Prioli et al., 2006).

Entre a linhagem AltoPR e um dos grupos de indivíduos da bacia do Rio Paraíba do Sul retornados pelo BLAST, aqui denominado PS1, a distância do gene *cox1* foi quase nula (ver Tabela 4), o que aponta seguramente que estes espécimes pertencem à mesma espécie. Em contraste, e curiosamente, a distância encontrada entre os demais indivíduos da bacia do Paraíba do Sul, aqui denominados grupo PS2, e o grupo AltoPR-D mostrou-se relativamente alta. Considerada apenas esta distância, surgiria a hipótese de haver ainda uma terceira espécie sob o nome *Astyanax altiparanae*, tendo em vista os trabalhos de Johns e Avise (1998) e Gomes (2011). Porém, quando considerado que esta distância é poucas vezes maior que a distância média no grupo AltoPR-D, e de acordo com Hebert et al. (2004), ainda não se pode chegar a uma conclusão em relação a isso.

Os resultados apontam que a identificação dos indivíduos considerados como *A. bimaculatus* pode precisar ser reconsiderada. De acordo com Garutti (1995 e 1998, apud Garutti e Britski 2000), *A. bimaculatus* não ocorre na bacia do Rio São Francisco, portanto pode-se propor considerar apenas a ocorrência de *A. lacustris* nesta bacia.

As espécies inclusas neste estudo se mostraram bastante próximas, e as hipóteses filogenéticas obtidas não são fortemente suportadas no que diz respeito à resolução das

espécies no gênero. Isso sugere que a dispersão da espécie ancestral e o isolamento das bacias devem ter ocorrido em um intervalo curto e relativamente recente. Este fato se assemelha ao quadro retratado por Mallet (2005), no sentido de que há um hiato pequeno entre diversidade intraespecífica e distância interespecífica, em comparação com o que Carvalho et al. (2011) e Pereira et al. (2011) encontraram nas bacias dos Rios Paraíba do Sul e São Francisco, respectivamente. Porém, o presente estudo abarca apenas um pequeno clado do gênero *Astyanax*, e pode não representar o todo.

Embora as relações filogenéticas entre os indivíduos de grupos diferentes não estejam claras, os resultados apontam que estes grupos são monofiléticos, e que os indivíduos de *A. lacustris* e *A. abramis* não correspondem nem a AltoPR nem a AltoPR-D, e portanto reforçam a ideia de que há uma espécie nova a ser descrita, dividindo o táxon definido atualmente como *A. altiparanae*. O grupo *bimaculatus* inclui outras espécies, e ainda que estas sejam mais nitidamente distintas pela taxonomia clássica, como é o caso de *A. paraguayensis* (Fowler 1918), convém incluí-las em estudos posteriores. Por outro lado, as espécies geograficamente mais próximas, que também ocorrem na bacia do alto Paraná, são filogeneticamente distantes, como mostra Marreta (2011).

O DNA mitocondrial, pelo seu mecanismo de herança, poderia apresentar relações filogenéticas contraditórias como consequência de fenômenos como introgressão. Por essa razão, um estudo que envolva sequências nucleares será interessante. Da mesma forma, dados citogenéticos como os de Fernandes e Martins-Santos (2004) podem servir de complemento à presente investigação; estes autores encontraram diferenças em escala cromossômica entre indivíduos coletados na bacia do Rio Ivaí e na região de Porto Rico. É curioso que essas diferenças tenham sido encontradas apenas em halopatria, e isso instiga estudos que confrontem esses dados com os dados moleculares aqui presentes. Também, tendo em vista que as espécies são unidades ecológicas, e que este aspecto é de fundamental interesse para ecólogos, um estudo detalhado sobre distribuição e comportamento de ambas as linhagens deveria ser realizado.

Outro fato observado neste estudo foi a ausência de indivíduos do grupo AltoPR na amostragem do Córrego Soares (SP), e de AltoPR-D na amostragem do Rio do Campo, afluente do Rio Paraná. A quantidade de espécimes genotipados, em ambos os casos, não permite supor que a amostra de ambas as populações seja representativa. No entanto, esta é a primeira indicação a sugerir a possibilidade de uma separação espacial dos grupos.

Por último, é necessário levar em conta que casos de espécies morfologicamente indistintas passaram a ser considerados apenas recentemente, e a distinção molecular não deve

ser considerada, equivalente a uma descrição da espécie. Sendo assim, estudos morfológicos mais intensivos serão necessários para que uma das linhagens de *A. altiparanae* seja considerada uma espécie válida, ainda que a taxonomia molecular possa confirmá-lo.

REFERÊNCIAS

- Bignotto TS, Prioli AJ, Prioli SMAP, Maniglia TC, et al. (2009). Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Braz. J. Biol.* 69: 681-689.
- Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu, PS, Leal CG, et al. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22: 80-86.
- Fernandes CA e Martins-Santos IC (2004). Cytogenetic studies in two populations os *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141:328-332.
- Garutti V (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae) com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. Tese de Livre-docência, IBILCE-Unesp. São José do Rio Preto.
- Garutti V (1998). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, 85: 115-122.
- Garutti V e Britski HA (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.* 13: 65-88.
- Gomes VN (2011). Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na identificação de espécies de peixes neotropicais. Master's thesis, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergence among closely related species. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio. (Suppl.)* 270, S96–S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS and Francis CM (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 2: 1657-1663.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, et al. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE* 3:e2490.
- Johns GC and Avise JC (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Biol. Evol.* 15 1481-1490.
- Mallet J, Isaac NJB and Mace GM (2005). Response to Harris and Froufe, and Knapp et al.: Taxonomic inflation. *Trends. Ecol. Evol.* 20: 8-9.
- Marreta MA (2011). Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial. Master's thesis, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro.

- Oliveira AV, Prioli AJ, Prioli SMAP, Bignotto TS, et al. (2006). Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.* 69: 260–277.
- Pereira LHG, Maia GMG, Hanner R, Foresti F, et al. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* 22: 71–79.
- Prioli SMAP, Prioli AJ, Julio HF Jr., Pavanelli CS, et al. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet.Mol. Biol.* 25: 421-430.
- Prioli AJ, Carlo VA, Soria TV, Prioli SMAP, et al. (2012). Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. *Genet. Mol. Res.* 11: 1064-1074.
- Soria TV (2004). Diversidade em seqüências da região controle do DNA mitocondrial de populações de *Astyanax* da bacia do alto Rio Paraná. Master's thesis, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Thompson J, Higgins . D and Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.

ANEXO**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *GENETICS AND
MOLECULAR RESEARCH***

(Disponível em <http://geneticsmr.com/node/5>, acessado em 15 de março de 2013)

Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes Book Review, Brief Note, Case Report, Comment, Correction, Errata, Homage, In Memoriam, Letter to the Editor, Methodology, Mini-Review, Obituary, Opinion, Point of View, Research Note, Retraction, Review, Review Article, Short Communication, and Thesis Abstract, with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review published by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

The journal is maintained by the not-for-profit scientific foundation Ribeirão Preto Foundation for Scientific Research (FUNPEC-RP) and the articles are open access. The fee per accepted submission is R\$ 1.380.00 for Brazilian authors and US\$820.00 for authors from other countries. The US dollar amount reflects the approximate current foreign exchange rate and is subject to change. This fee covers part of the expenses for final language and technical revision, for page setup, and for publishing online.

Payment of the publishing fee should be made by the authors only after receiving a letter of acceptance. After payment is received by our office, the manuscript will be processed further for publication. Payment, both from within or outside Brazil, should be made by bank transfer (Banco do Brasil or City Bank) or by credit card (Visa and MasterCard). • Please contact the editorial office [gmr@geneticsmr.com] if you have any questions.

All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the study. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their research. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.geneticsmr.com>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@geneticsmr.com] or by regular mail (in files on a CD or DVD) to: Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte, Editor. Rua: Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista, 14025-220 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered names, trademarks, etc., in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be posted to the above address or faxed to the journal at 55 (16) 3621-1991. Galley proofs will be sent in “pdf” form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check

the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages. How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online), once were fully processed. Papers accepted in their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@geneticsmr.com] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word's "Heading" or "Style Sheets". Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions:

Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent. Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript. A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than six key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no

more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means \pm SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to 4 separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. The placing of graphics in the paper should be indicated in the text and should include the captions for the figures. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to “unpublished results” and “submitted papers” should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.

References, under the heading “References”, should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

General information of GMR style

The Journal has a general format. You should always follow the general rules for the Journal concerning punctuation, use of capitals, italics, spaces, etc.

1. Title: only the first letter of the title is capitalized. If a proper noun is used in the title the first letter is also capitalized.

2. Authors: comma between each author except for the last two where “and” is used. Initials, no space.

3. Institutions: if more than one, superscript numbers correspond with authors. Observe

order: Laboratory, Department, Faculty, University, city, state, country (no final periods)

4. Key words: each key word uses the first letter capitalized and is separated by semicolons.

5. INTRODUCTION, MATERIAL and METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and ACKNOWLEDGMENTS are considered to be Title 1 (all letters are capitalized).

6. Title 2, which is a subtitle under Title 1, uses only the first letter capitalized. Title 3, which is a subtitle under Title 2, is in the same format but italicized. All on a separate line. 7. References are cited by name, followed by year of publication (by chronological order) in the text. Ex.: (Kim et al., 2006; Chen et al., 2009). See a recent publication for details.

8. Tables and Figures are cited in capital letters, write out in full, not abbreviated, and following the order of citation in text (For ex.: Figure 1, Figure 2, Figure 3, and so on).

9. Abbreviations: check the abbreviations used. They should be consistent throughout the manuscript (Since Introduction) and must be explained (if it is the case for those not known in general) only at first use (independent of the section). If the Abbreviation is not needed further in the article, it can be omitted. Definitions do not have capital letters. Ex: expressed sequence tags (ESTs); polymerase chain reaction (PCR) not PCR reaction.

10. Italics are used for scientific names (bacteria, Latin names, etc.). They should be cited in full, not abbreviated, at first use (from Introduction on); other citations are abbreviated. Ex.: *Bos taurus* (1st citation), *B. taurus* in others. Anatomic terms use normal type: area postrema, pars medialis, lamina propria, locus coeruleus, etc.

11. English from England is only used if the article is from British authors.

12. Two measures = use bar: mL/kg; three measures = use -1 (superscript) and a period (alt + 0183) mg·kg⁻¹·h⁻¹.

13. Italics are used for certain abbreviations: im, ip, sc, g (centrifugation), in vivo, in vitro, in situ, per se, vs (but versus, in normal type).

14. Note the following examples of spacing and use of capitals: $P \geq 0.05$, $P \leq 0.05$, $P = 0.05$, $N = 10$, 6.0 g, 1.2 μm , 12.2%, 37°C, means \pm SEM, means \pm SD, >76, etc.

15. Abbreviations used: s, second; min, minute; h, hour; am; pm; m, meter; cm, centimeter; km, kilometer; L, liter, kDa, kilodaltons; cM, centimorgans; mya (million years ago, not M.Y.A.); pH; kHz; kg; kcal; IU; W; ms; sp and spp (both in normal type, no period); v/w; v/v; mAb; BALB/c; etc. But, day(s), week(s), years(s) always in full, not abbreviated.

16. HDL-C, HDL-C, VLDL-C (for high-density lipoprotein cholesterol, etc.), Tris-HCl, not tris-HCl. 17. M (not mol/L); pM (not pmol/L); mM (not mmol/L), etc.

18. Km or K_M (Michaelis constant), HO and HE (observed and expected heterozygosity), NA (allelic number), FST; FIS; FIT; Nm; OR; 95%CI; OD; ID; etc.

19. Other examples: Data were analyzed by the Student *t*-test (the *t* is always italicized and joined with a hyphen to the word test), by the Mann-Whitney U-test or by the chi-square test and are reported as means \pm SD for $N = 10$ animals per group (for at least three independent experiments). ANOVA, MANOVA, d.f. (degrees of freedom).

20. 1st, 2nd, 3rd (normal type, without superscript). 21. 1X PCR buffer; 200X magnification; 10 mL 1% polygalacturonic acid (not 10 mL of.....); 0.2 M sodium acetate buffer, pH 4.5, 10 mL crude enzyme, [100 mM Tris-HCl (not Tris-HCl 100 mM)], [2% PVP (w/v) (not PVP 2% (w/v))]; 20 mL 0.4% Trypan blue solution; 2 to 3 mL 1% lidocaine, etc.

22. 6×10^3 ; 2.5×10^{-2} ; 1 x 5 cm; Al³⁺ (not Al+3); 6.58 vs 6.18 mm (not 6.58 mm vs 6.18 mm); 50 to 80% (not 50% to 80%), etc.

23. cmH₂O; mmHg; cf.; ca.; i.e.; e.g.; No.; Ref.

24. Manufacturers: the country of origin should be cited only the first time the manufacturer is mentioned. Obs.: Following the manufacturer protocol/following manufacturer protocols (both without apostrophe plus “s”).

25. Numerals: 1000 (no comma; not necessary), 10,000, 10,000,000 (with comma).

26. On (not in) agarose gel, in (not on) liquid medium, on solid medium, on agar plates, etc.

Examples of bibliographic style

JOURNAL (Standard article). Ex.:Chao EC and Lipkin SM (2006). Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res.* 34: 840-852.

Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, et al. (2007). Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr. Res.* 61: 105-110.

BOOK, WHOLE: authors, year, book title, edition or volume number, publisher, city. Ex.:

Bartholomei-Santos ML and Sokal RR (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Cicotti and Tildesley DJ (1987). *Computer simulation of liquids*. 1st edn. Oxford University Press, New York.

BOOK CHAPTER: authors, year, book title, chapter title, editors, edition, publisher, city, pages of citation. Ex.:

Drosopoulou E (1981). The Drosophilidae: A Taxonomic Overview. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN Jr, eds.). Academic Press, New York, 1-97.

REPORT. Ex.:

CIAT (International Center for Tropical Agriculture)(1980). *Annual Report*. CIAT, Cali.

FAO (Food and Agricultural Organization) (2004). *Production Yearbook*. FAO, Rome.

THESIS. Ex.:

Hellmann K and Gömori G (1997). *Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomíneos do gênero Rhodnius*. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto. Pepin L (2003). *Aplicação de marcadores microssatélites de Sus scrofa doméstica na caracterização genética de populações de Sus scrofa sp (porco-monteiro) e Tayassu pecari (queixada)*. Doctoral thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

CONFERENCE, SYMPOSIUM PROCEEDINGS: cite papers only from published proceedings. Ex.:

Lehninger AL, Silva MB, Lombardi F, Zamaro PJA, et al. (2002). Análise do comportamento eletroforético das frações de hemoglobinas de *Rhinoclemys punctularia* (Chelonia) em diferentes pH. In: *Anais do 48º Congresso Nacional de Genética*, Ribeirão Preto. 2

Olsen GJ, Ludwig T, Meier H and Wolf MJ (2002). AxML: a fast program for sequential and parallel phylogenetic tree calculations based on the maximum likelihood method. *Proceedings of 1st IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB2002)*, Palo Alto, 21-28.

Pacheco EB and Miyazawa CS (2002). Estudos citogenéticos em Cheirodontinae (Characiformes, Characidae) do pantanal do Mato Grosso. In: *IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá, 38.

Schaeffer LR, Swalve HH and Dekkers JCM (1994). Random regressions in animal models for test-day production in dairy cattle. *Proceedings of the 5th World Congress of Genetic and Applied Livestock Production*, Guelph, 433-446.

ELECTRONIC CITATIONS (Online Journals): ensure that URLs are active and available. Ex.:Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3: Bioinformatics Methods and Protocols. In: *Methods in Molecular Biology* (Krawetz S and Misener S, eds.). Humana Press, New Jersey, 365-386. Available at [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi].

INTERNET COMMUNICATION: Ensure that URLs are active and available. Ex.:
HTML. HyperText Markup Language. Available at
[<http://www.w3.org/TR/html401/>]. Accessed August 23, 2007.
NCICB. National Cancer Institute Web Services. Available at
[http://ncicb.nci.nih.gov/inrastructure/cacore_overview]. Accessed August 23, 2007.
Wolf MJ (2005). Global review of commercialized transgenic crops: 2005. The
International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Available at
[<http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34/pk/index.htm>]. Accessed August 21, 2006.