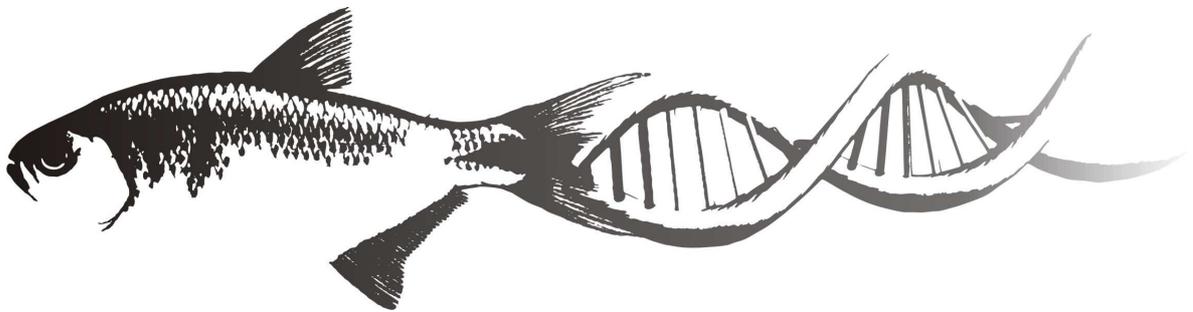


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

RODRIGO DE MELLO

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



Maringá

2009

RODRIGO DE MELLO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.
Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

Maringá

2009

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

M527r Mello, Rodrigo de, 1980-
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 seqüências de gene mitocondrial / Rodrigo de Mello. – Maringá, 2009.
43 f. : il. (algumas color.).
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2009.
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
1. *Astyanax* (Teleostei - Characidae) "lambari" - Filogenia e biogeografia - Iguaçu, Rio, Bacia. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em "Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais".

CDD 22. ed. -597.4813809816
NBR/CIP - 12899 AACR/2

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO DE MELLO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Profª Drª Carla Simone Pavanelli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 27 de Janeiro de 2009.

Local de defesa: Anfiteatro do Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

“A orientação inicial que alguém recebe da educação
também o marca na sua conduta ulterior.”

(Platão)

"A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar,
mas difíceis de arrastar; fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar."

(Henry Peter)

“Reconhece-se uma árvore pelos seus frutos”

(Mateus, 7)

Aos que estiveram e sempre estarão comigo, minha família. Em especial, aos ramos mais recentes desta árvore: Leopoldo, Enzo, Maria Fernanda e Ana Carolina.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família, pelas oportunidades, exemplos e amparo. Em especial ao meu pai, pela confiança e paciência em minha ausência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, pela formação.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPELIA), pela aprendizagem e oportunidades de aprimoramento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Alberto José Prioli, pela orientação, liberdade, confiança e portas dos laboratórios sempre abertas.

Ao Programa Ecológico de Longa Duração (PELD-Site 6), pela oportunidade de aprendizado biológico-prático e pelo sentimento de trabalho em equipe, desenvolvidos durante os trabalhos esporádicos que participei.

À Aldenir Cruz Oliveira e Jocemara Celestino dos Santos, da secretaria do Programa de Pós-graduação em Ambientes Aquáticos Continentais, pela eficiência dos trâmites burocráticos que foram necessários ao longo do curso.

À Maria Salete R. Arita e João Fábio Hildebrandt, da biblioteca do NUPELIA, pela presteza e agilidade prestadas às necessidades literárias requeridas durante o curso.

A todos os companheiros, alunos e funcionários do laboratório de Genética Geral do NUPELIA pelas ajudas, companheirismo e aprendizado.

Ao Msc. Hector Veras Alcaraz, à Dr^a. Carla Pavanelli e ao Dr. Weferson Júnio da Graça do Museu de Coleção Ictiológica do NUPELIA (UEM) pela identificação morfológica de amostras.

Ao doutorando Thiago Cintra Maniglia, pela paciência, conhecimento partilhado e auxílio com as análises estatísticas.

À Profª. Drª. Sônia Maria A. P. Prioli, (UEM) pelas amostras de DNA disponibilizadas e pelos exemplo de conduta pessoal.

Ao Prof. Dr. Eduardo Palma (Universidade Católica do Chile) pela oportunidade concedida, que me permitiu aprender mais sobre estudos de Filogenia e Biogeografia.

Ao doutorando Enrique Rodriguez-Serrano (Universidade Católica do Chile) pelas dicas e esclarecimentos acerca de análises filogenéticas específicas.

Aos amigos de graduação, pós-graduação, de adolescência e de infância que, além da sincera amizade, sempre me deram incentivo para o aperfeiçoamento.

Ao amigo e Prof. Msc. Rafael Rigolon (Universidade Federal de Viçosa), pela amizade, troca de idéias e revisão textual.

A todos que de alguma forma me ajudaram a compreender melhor o pensamento biológico.

Aos pessimistas e invejosos, pelo incentivo.

Por fim, à Natureza, que proporciona contemplações e indagações para que continuemos em busca constante de respostas, que lançam luz ao nosso limitado entendimento sobre o que nos cerca.

“Todas as nossas incomodações, se verificarmos com cuidado suas origens, provém
quase todas do fato de não termos consciência da natureza do tempo”

(Dante Alighieri)

“Nasce-se, pois, com as forças desequilibradas
do pretérito para as tarefas do reajuste”

(Emmanuel)

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 seqüências de gene mitocondrial

RESUMO

As relações filogenéticas entre trinta e oito indivíduos de *Astyanax* provenientes do rio Iguaçu e de bacias adjacentes, foram examinadas pelo seqüenciamento nucleotídico parcial do gene mitocondrial citocromo *b*. Análises filogenéticas de união-de-vizinhos, máxima-verossimilhança e de enfoque bayesiano foram realizadas utilizando-se de metodologias e programas computacionais específicos. Os clados gerados no presente estudo sugerem o reconhecimento de, no mínimo, três grupos que compartilham origens semelhantes aos lambaris endêmicos do rio Iguaçu, sugerindo que os *Astyanax* do rio Iguaçu não se diversificaram a partir de um único ancestral que ficou isolado quando a bacia se formou. Portanto, o polifiletismo no Iguaçu seria intragenérico, referindo-se à possibilidade de três grupos de *Astyanax* terem ficado isolados durante a formação da bacia. *Astyanax* sp. B teria uma origem compartilhada com algumas espécies do ‘complexo altiparanae-bimaculatus’ enquanto que *Astyanax* sp. C seria do grupo que também abrigaria *A. aff. paranae* e *A. bockmanni*. A divergência entre *Astyanax* sp. E e *Astyanax* sp. F teria ocorrido num passado mais recente quando comparada à diferenciação da espécie *Astyanax* sp. D. Os eventos geológicos e hidrológicos que teriam influenciado o padrão biogeográfico das espécies analisadas são discutidas.

Palavras-chave: Filogenia. Citocromo *b*. Sequenciamento de DNA. *Astyanax*. Biogeografia.

Phylogenetic and Biogeographic relationships among species of the genus *Astyanax* (Teleostei-Characidae) from Iguaçú River basin, Upper Paraná river and Paraguay river basin based on sequences of mitochondrial gene

ABSTRACT

Phylogenetic relationships among thirty-eight individuals of *Astyanax* from Iguaçú River and adjacent river basins, were examined by nucleotidic sequencing in the mitochondrial gene cytochrome *b*. Phylogenetic analysis of neighbor-joining, maximum-likelihood and bayesian approach were carried out using methodologies and specific computacional programs. The clades brought up in this study suggest the recognition of, at least, three groups that share similar origins with the endemic *lambaris* from Iguacu River, suggesting that there is poliphyletism in the ancestry in *Astyanax* from this location, suggesting that *Astyanax* from this river did not diversify from a unique ancestor group that was isolated when the Iguacu River basin was formed. Thus, polyphyletism of this genera in Iguaçú River would be intrageneric, when it refers to the possibility of three groups of *Astyanax* have been isolated during the formation of this river basin. *Astyanax* sp. B would have an origin shared with some especies from the 'complex altiparanae-bimaculatus' while *Astyanax* sp. C would be from the same group that also hosts *A. aff. paranae* and *A. bockmanni*. The divergence between *Astyanax* sp. E and *Astyanax* sp. F would have occurred in a more recent past when compared to the differentiation of the species *Astyanax* sp. D. Geological and hidrological events that would have influenced the biogeography pattern of the analised species are discussed.

Keywords: Phylogeny. Citocrhome *b*. DNA sequencing. *Astyanax*. Biogeography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Código amostral, espécies e localidades dos indivíduos analisados	18
Figura 1	Árvores de união-de-vizinhos e de máxima verossimilhança.....	22
Tabela 2	Distâncias Genéticas dentro de cada clado.....	23
Tabela 3	Distâncias Genéticas entre os clados.....	25
Tabela 4	Distâncias Genéticas dentro de cada grande grupo.....	26
Tabela 5	Distâncias Genéticas entre os grandes grupos.....	26
Figura 2	Gráfico 3D de dispersão em coordenadas principais (Auto-Vetores)	27
Figura 3	Árvore obtida pelo critério bayesiano <i>a posteriori</i>	28

Dissertação elaborada e
formatada conforme as normas da
publicação científica *Neotropical
Ichthyology*. Disponível em:
<<http://www.ufrgs.br/ni/>>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1	Material biológico e locais de coleta	17
2.2	Extração de DNA.....	17
2.2	DNA mitocondrial, amplificação e sequenciamento	18
2.3	Análises filogenéticas e genealógicas	19
3	RESULTADOS.....	21
4	DISCUSSÃO.....	29
5	REFERÊNCIAS.....	36

INTRODUÇÃO

Peixes caracíformes fornecem um exemplo dos complexos padrões evolutivos e biogeográficos geralmente vistos nas faunas tropicais e subtropicais. Eles constituem um grupo de peixes de divergências ecológicas e morfológicas em rios e lagos na África e nos Neotrópicos. A vasta especialização trófica encontrada nos caracíformes é comparável aos dos ciclídeos e incluem detritívoros, herbívoros, planctívoros e predadores. Algumas espécies têm adaptações morfológicas e fisiológicas peculiares para sobrevivência em condições extremas de hipoxia, condições estas geralmente encontradas em meio ambientes como planícies de inundação (Orti & Meyer, 1997)

Dezoito famílias com cerca de 270 gêneros e, pelo menos, 1674 espécies compõem a ordem Characíformes (Nelson, 2006). A maioria das linhagens (famílias) de peixes caracíformes originou-se antes do evento vicariante que separou os táxons africanos e neotropicais, há aproximadamente cem milhões de anos atrás (Greenwood, 1984; Meyer *et al.*, 1990; Meyer, 1993).

Characidae faz parte da ordem Characíformes e é uma grande e diversificada família que tem mudado muito com a remoção das subfamílias Crenuchinae e Characidiinae, agora reconhecidas na família Crenuchidae (Nelson, 2006). As variações nas estratégias de vida dos caracídeos estão presentes de forma muito evidente, tanto que este grupo exhibe uma divergência fenotípica adaptativa tão grande que não se iguala a nenhuma outra ordem animal (Fink & Fink, 1981). Engloba, ainda, a maior parte dos peixes brasileiros de água doce, sendo que nas Américas do Sul e Central, devida à natureza de alta heterogeneidade, as espécies são agrupadas por subfamílias com diferentes autorias. Somente aquelas subfamílias nas quais há evidências de monofilia são retidas, deixando, desta forma, uma grande porção da diversidade em Characidae listadas sob a denominação *Incertae Sedis*, que incorpora oitenta e oito gêneros com cerca de 620 espécies reconhecidas. Entre elas, 64%, ou 399 espécies, são atribuídas à especiose. (Reis *et al.*, 2003).

O grande número de espécies incluídas nesta família, associado à imensa variedade morfológica, de hábitos alimentares diversos e exploração de uma infinidade de habitats (Britski *et al.*, 1998) tem dificultado proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro dela. Como consequência, o reconhecimento das relações de parentesco com as demais famílias da ordem Characíformes têm sido muito prejudicadas devido a dúvidas sobre o monofiletismo da família Characidae (Lucena, 1993).

O gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 é o mais comum e diversificado da família Characidae na área de abrangência da região neotropical, indo desde o Texas ao nordeste da Argentina, congregando aproximadamente uma centena de espécies abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras (Garutti & Britski, 2000; Lima *et al.*, 2003). Até agora, o gênero comporta cerca de cem espécies validadas e recentes descrições tendem a aumentar esse número (e.g. Azpelicueta *et al.*, 2002; Azpelicueta *et al.*, 2003; Casciotta *et al.*, 2003; Lima & Zuanon, 2004; Bertaco & Lucinda, 2005; Haluch & Abilhoa, 2005; Bertaco & Lucena, 2006; Melo & Buckup, 2006). São conhecidos vulgarmente como lambaris ou piabas e habitam diversos ambientes, inclusive as águas de cabeceiras de rios e riachos. Seus exemplares apresentam tamanho reduzido, tendo como principais características morfológicas: nadadeiras adiposas geralmente presentes; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão, e escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1988).

O grupo é reconhecidamente de difícil identificação taxonômica (Lowe-McConnell, 1975) e atualmente está alocado entre vários gêneros *Incertae Sedis* de Characidae, anteriormente nominados entre os Tetragonopterinae (Lima *et al.*, 2003). Estudos sistemáticos têm enfatizado que os representantes de *Astyanax* compõem complexos de espécies distintos de taxonomia controversa (Reis *et al.*, 2003).

Apesar do grande número de estudos com *Astyanax*, há relativamente pouco enfoque nas relações filogenéticas entre as espécies. É verdade que estudos citogenéticos (e.g. Pazza & Kavalco, 2007; Pazza *et al.*, 2007; Domingues, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Kantek *et al.*, 2008; Vicari *et al.*, 2008; Medrado *et al.*, 2008), de elucidação taxonômica entre espécies duvidosas (e.g. Prioli *et al.*, 2002), filogeografia intraespecífica (e.g. Strecker *et al.*, 2004) e de revisão taxonômica específica (e.g. Melo, 2005) vêm contribuindo para a elucidação de hipóteses formuladas acerca de relações e polimorfismos inter e intraespecíficos. Estudos sobre relações filogenéticas e biogeográficas, no entanto, foram realizados mais ao nível de famílias de Characiformes e suas potenciais dispersões (Orti & Meyer, 1997; Calcagnotto *et al.*, 2005). Moyses & Almeida-Toledo (2002) utilizaram o DNA mitocondrial de algumas espécies de *Astyanax* que revelaram diversidade nucleotídica entre elas.

O conhecimento dos padrões de divergência genética de várias espécies e populações, de suas relações histórico-evolutivas, bem como as peculiaridades do meio ambiente de cada bacia hidrográfica são de suma importância para o maior entendimento das relações

filogenéticas e biogeográficas dos organismos (Futuyma, 1986). A distribuição das espécies do gênero discutido tem influência direta nos processos evolutivos do grupo e em sua exuberante diversidade. Estruturas populacionais e intraespecíficas dentro de um mesmo rio e a capacidade de explorar grande variedade de micro *habitats*, formando pequenas populações com dispersão relativamente restrita, levaram Garutti & Britski (2000) a sugerir que estes peixes não formam um grupo uniforme e que apresentam variações de população para população.

A ictiofauna da bacia do rio Iguazu tem uma história evolutiva peculiar, com um alto índice de endemismo, sendo que aproximadamente 80% das espécies são exclusivas a esta bacia hidrográfica (Agostinho & Gomes, 1997). O processo geomorfológico de formação da bacia do Iguazu remonta do Período Terciário, estando associado a movimentos verticais escalonados responsáveis pelo soerguimento da Serra do Mar e a origem dos três planaltos paranaenses; sendo o primeiro na região de Curitiba, o segundo na região de Ponta Grossa/Palmeira e o terceiro na região de Guarapuava/Palmas (Petri & Fulfaro, 1983). O Iguazu constitui-se, assim, num rio geologicamente antigo, porém rejuvenescido por levantamentos diversos, caracterizados por corredeiras e saltos, alternados por meandros de curvaturas amplas e várzeas extensas (Ministério das Minas e Energia, 1990).

Devido ao surgimento das Cataratas do Iguazu, ocorrido há aproximadamente 22 milhões de anos (Período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da bacia do rio Iguazu foram isoladas das do rio Paraná por estas quedas, que apresentam cerca de 70m de desnível (Maack, 1981). Tal fato favoreceu um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna (Kantek *et al.*, 2003). O rio Iguazu apresenta uma ictiofauna pobre comparada à do rio Paraná (Garavello *et al.*, 1997). Isto se deve principalmente a topografia do rio, com suas quedas e corredeiras, que impossibilitam a subida de peixes e a realização de migrações.

O isolamento geográfico de espécies de peixes pode determinar processos evolutivos significativos nas comunidades, eventualmente levando a especiações. Tais populações isoladas são mais suscetíveis a mudanças evolutivas, que podem ser mais ou menos aceleradas dependendo dos distintos ambientes em que estão inseridos. De acordo com Futuyma (1986), populações distantes geograficamente ou aquelas nas quais não há fluxo gênico são mais frequentemente isoladas por esterilidade e diferenças comportamentais do que populações próximas.

Este trabalho pretende contribuir para a elucidação das relações evolutivas entre as espécies de *Astyanax*, que tem sido sugerida por vários autores (e.g. Weitzman & Malabarba,

1998; Domingues *et al.*, 2007; Pazza & Kavalco, 2007; Pazza *et al.*, 2007; Kantek *et al.*, 2008; Medrado *et al.*, 2008), os quais ressaltam a importância de aplicações de técnicas de filogenias moleculares à sistemática dos caraciformes, mais especificamente dentro do gênero *Astyanax*. Assim, o presente estudo comparou as espécies endêmicas do rio Iguaçu às espécies de *Astyanax* de outras bacias. Além disso, contribui no aumento dos estudos em peixes de água doce na América do Sul, que têm sido extremamente úteis para revelar diferenças genéticas intra e interespecíficas, trazendo à tona dados relevantes acerca das espécies e a evolução da biodiversidade na região tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico e Locais de Coleta: Indivíduos do gênero *Astyanax* foram coletados nas bacias do rio Iguaçu, do alto rio Paraná, do rio Paraguai, do rio Paranaíba e do rio Cuiabá; além de cinco seqüências nucleotídicas que estavam disponibilizadas no *Genbank* (Acessos AF287414.1; AY639091.2; AY639092.2 e AY639089.2, disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como podem ser vistos na Tabela 1. Os exemplares foram preservados em álcool etílico comercial. A identificação morfológica da maioria dos espécimes foi realizada baseando-se em Severi & Cordeiro (1994), Garavello *et al.* (1997), Ingenito *et al.* (2004), Britski *et al.* (2007) e Graça & Pavanelli (2007) na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Extração de DNA: A extração total do DNA ocorreu de acordo com a metodologia fenol/clorofórmio de Laird *et al.* (1991) e Monesi *et al.* (1998) com poucas modificações. Aproximadamente 100 mg de músculo de cada caracídeo foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, homogeneizados em 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e 500 µL de tampão TH (Tris -HCL 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL) em banho-maria com agitação a 37 °C. Em seguida, o DNA foi purificado por extração fenol/clorofórmio (1:1, v:v) e clorofórmio, respectivamente, sendo centrifugado em 12.000 rpm por 12 minutos.

O DNA extraído foi precipitado com a adição de solução salina (NaCl 5 mM) e etanol absoluto gelado, seguida de uma incubação a -20 °C por 12 a 24 horas. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,01 mM EDTA), com RNase (20 µg/mL). A suspensão de DNA foi estocada a -20 °C. Alíquotas do DNA de cada exemplar foram utilizadas para uma estimativa visual da quantidade de DNA, em gel de agarose (1%) e corados com brometo de etídio (20 µg/100 mL), por comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ.

Tabela 1. Código amostral, espécie e localidades (BRA: Brasil; PRY: Paraguai) dos indivíduos analisados. Os *A. fasciatus* com asteriscos (*) representam os haplótipos, denominados entre parênteses.

Código Amostral	Espécie	Localidade
A.sp-481	<i>Astyanax</i> sp.	Rio Pitangui – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.sp-488	<i>Astyanax</i> sp.	Rio Tibagi – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.sp-12	<i>Astyanax</i> sp.	Rio Manso - MT. Bacia do rio Paraguai - BRA
A.alti-674	<i>A. altiparanae</i>	Rio Pitangui – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.sp-5	<i>Astyanax</i> sp.	Rio Passa Cinco - SP. Bacia alto rio Paraná - BRA
A.abra-1	<i>A. abramis</i>	Arroyo Yacaré – Dpto Neembucu. Bacia Rio Paraguai - PRY
A.abra-3	<i>A. abramis</i>	Arroyo Yacaré – Dpto Neembucu. Bacia Rio Paraguai - PRY
A.abra-4	<i>A. abramis</i>	Arroyo Yacaré – Dpto Neembucu. Bacia Rio Paraguai - PRY
A.abra-45	<i>A. abramis</i>	Rio Cuiabá – MT. Bacia do Rio Paraguai -BRA
A.abra-51	<i>A. abramis</i>	Rio Cuiabá – MT. Bacia do Rio Paraguai -BRA
A.asun-6	<i>A. asuncionensis</i>	Rio Cuiabá – MT. Bacia do Rio Paraguai -BRA
A.asun-8	<i>A. asuncionensis</i>	Rio Cuiabá – MT. Bacia do Rio Paraguai -BRA
A.fasc-496	<i>A. fasciatus</i>	Rio Tibagi – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.fasc-497	<i>A. fasciatus</i>	Rio Tibagi – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.fasc-498	<i>A. fasciatus</i>	Rio Tibagi – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
A.fasc-604	<i>A. fasciatus</i>	Rio Pitangui – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA
<i>A. fasciatus</i> (FE)*	<i>A. fasciatus</i>	AY639088.2 – GeneBank (América Central)
<i>A. fasciatus</i> (GA)*	<i>A. fasciatus</i>	AY639089.2 – GeneBank (América Central)
<i>A. fasciatus</i> (GC)*	<i>A. fasciatus</i>	AY639091.2 – GeneBank (América Central)
<i>A. fasciatus</i> (GD)*	<i>A. fasciatus</i>	AY639092.2 – GeneBank (América Central)
AM AF287414.1	<i>A. mexicanus</i>	AF287414.1 – GeneBank (América Central)
A.aff.bim-1	<i>A. aff. bimaculatus</i>	Rio Doce – MG. Bacia Rio Doce - BRA
A.aff.para-1	<i>A. aff. paranae</i>	Ribeirão Keller – PR. Bacia alto rio Paraná - BRA
A.bock-1	<i>A. bockmanni</i>	Riacho “Lazinho” – GO. Bacia do rio Paranaíba - BRA
A.sp.B-1	<i>Astyanax</i> sp. B	Salto Osório - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.C-2	<i>Astyanax</i> sp. C	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.C-10	<i>Astyanax</i> sp. C	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.C-11	<i>Astyanax</i> sp. C	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.D-25	<i>Astyanax</i> sp. D	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.D-26	<i>Astyanax</i> sp. D	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.D-27	<i>Astyanax</i> sp. D	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.E-1	<i>Astyanax</i> sp. E	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.E-2	<i>Astyanax</i> sp. E	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.E-3	<i>Astyanax</i> sp. E	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.F-2	<i>Astyanax</i> sp. F	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.F-56	<i>Astyanax</i> sp. F	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
A.sp.F-130	<i>Astyanax</i> sp. F	Rio Iguaçu - PR. Bacia do rio Iguaçu - BRA
Moenkhausia	<i>M. aff. intermedia</i>	Rio Paraná – PR. Bacia do alto rio Paraná - BRA

DNA Mitocondrial, amplificação e seqüenciamento: O gene citocromo *b* (*cytb*) foi a região do DNA mitocondrial (*mtDNA*) utilizada para a investigação das relações filogenéticas das espécies de *Astyanax* estudadas. Amplificou-se parcialmente o gene *cytb* mediante a Reação de Cadeira Polimerase (*PCR*) a partir do DNA total de indivíduos. Para tal feito, foi utilizado o par de *primers* L14841 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') e H15149 (5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'). As condições de amplificação seguiram as apresentadas por Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação de amplificação consistiu-se basicamente de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. O fragmentos de *mtDNA* foram amplificados segundo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 95°C

por um minuto, continuando com 35 ciclos de 95°C (15 seg.), 53°C (30 seg.), 72°C (30 seg.). Uma extensão final de 72°C por oito minutos terminou a reação.

Em seguida, alíquotas desses produtos foram visualizados num gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 20 mg/100 mL) para comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ , determinando, assim, o tamanho da seqüência dos genes amplificados. Posteriormente, as amostras foram purificadas usando-se polietileno glicol (PEG) para eliminação do excesso de *primers* e resíduos de nucleotídeos segundo protocolo de Rosenthal *et al.* (1993).

Por último, as amostras de DNA (cerca de 50 ng) amplificado em cada reação de PCR foram usadas diretamente em reações de seqüenciamento com *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing*, em um seqüenciador automático *MegaBACE 1000 (DNA Analysis System)*, de acordo com instruções do fabricante.

Análises filogenéticas e genealógicas: Todas as seqüências amplificadas do gene mitocondrial citocromo *b* foram alinhadas com o programa *ClustalW* (Higgins *et al.*, 1996) e editadas pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1* (Hall, 1999). Em seguida as seqüências foram analisadas utilizando-se o programa *ModelTest 3.7* (Posada & Crandal, 1998) para seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica entre as distintas taxas de substituição que explica a matriz de dados gerados.

Para as análises filogenéticas foi usado o programa *PAUP 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Sworfford, 2000)*. Todos os caracteres foram tratados como não-ordenados com quatro estados possíveis (A, C, T e G) e excluindo-se aqueles caracteres filogeneticamente não-informativos.

Num enfoque de inferência cladística, a análise dessa linha filogenética foi feita por meio do critério de máxima-verossimilhança (*maximum-likelihood*) - método que elege o melhor modelo de substituição nucleotídica que maximiza uma probabilidade, para gerar uma árvore sob a hipótese inferida mais adequada. Uma análise genealógica de cunho fenético foi feita mediante o algoritmo união-de-vizinhos (*neighbor-joining*) para gerar uma matriz de distância a partir da opção de Tamura-Nei. A seleção desse algoritmo estima as relações genealógicas pela minimização das distâncias entre os táxons e dentro da árvore, gerando assim, um índice de semelhança. A construção da árvore *neighbor-joining* foi realizada usando-se do modelo de substituição nucleotídica sugerido pelo *Modeltest 3.7* (Posada & Crandall, 1998). Os valores mais confidentes nos nodos foram avaliados perfazendo-se mil repetições (*bootstrap*) retendo-se aqueles com freqüência maior que 50%, os quais foram utilizados para avaliar o suporte para clados individuais dentro de cada árvore. Enraizaram-se as árvores geradas com

o critério de grupos externos (*outgroups*) usando-se *Moenkhausia* aff. *intermedia* pelo fato deste gênero, que comporta essa espécie, ter sido colocado como táxon próximo de *Astyanax* no estudo de Calcagnotto *et al.* (2005).

Utilizando-se o programa *Mega 4.0*, gerou-se uma matriz de distância Tamura-Nei das seqüências nucleotídicas dos exemplares e, a partir dessa, obteve-se a matriz de auto-vetores pelo programa *DistPCoA* (Legendre & Anderson, 1998). Em seguida, um gráfico de dispersão em coordenadas principais foi confeccionado utilizando-se os três primeiros auto-vetores (eixos) por meio do programa *STATISTICA 6.0* (StatSoft, Inc., 2001).

Também se realizou uma análise bayesiana, na qual calculou-se a probabilidade posterior das relações genealógicas sob o melhor modelo de evolução previamente escolhido no *Modeltest 3.7*. Para explorar melhor esse parâmetro, correu-se as Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo (*MCMC*) por meio do programa *MrBayes 3.0* (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). As 20.000 primeiras gerações (e 1.333 árvores) foram descartadas pela opção *burn-in* e somente os resultados das últimas 280.000 gerações (28.667 árvores) foram usados para computar o consenso acima de 50% na retenção dos ramos da árvore gerada.

Por último, obtiveram-se as freqüências de bases nucleotídicas, números de transições e transversões entre os indivíduos, mediante o programa *Mega 4.0 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura *et al.*, 2007).

RESULTADOS

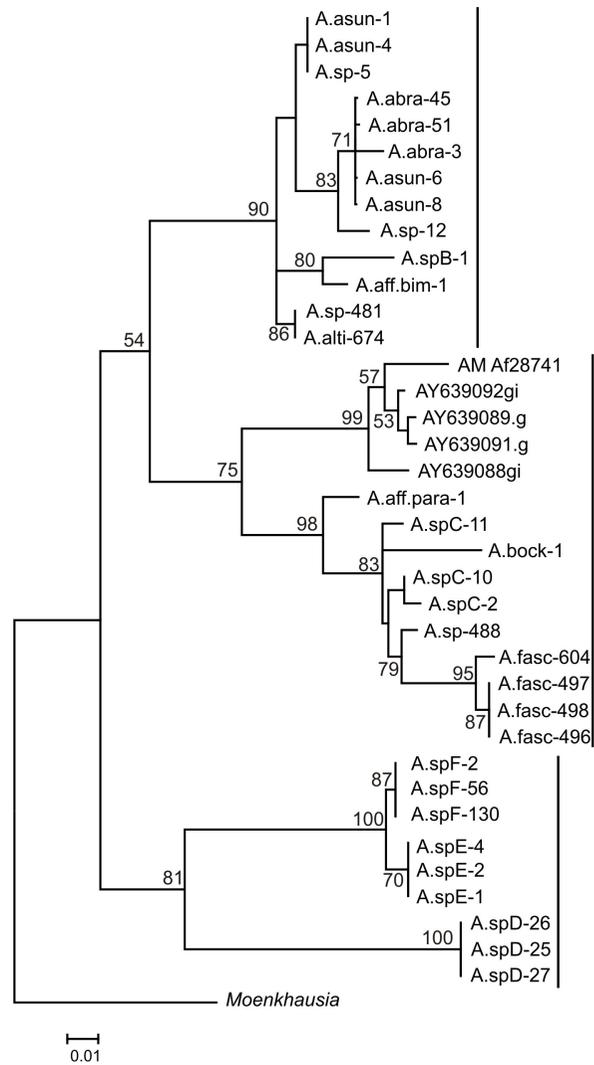
Um fragmento de 308 pares de bases (pb) do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial foi seqüenciado para cada espécime deste estudo (Tabela 1), com exceção dos indivíduos que foram utilizados do *GeneBank*. Depois de alinhadas e editadas, utilizou-se uma seqüência de 200 pares de bases (pb) para as análises, devido a maior porcentagem de confiança encontrada nesse intervalo.

As informações geradas pelo método *likelihood*, sob os critérios de correção Akaike (*AIC* – Akaike, 1974), consideraram os valores de proporção de sítios variáveis; obtendo-se como ótimo o modelo TrN+I (-lnL = 1008.1279, AICc = 2.290.8320). As frequências das bases nucleotídicas foram de freqA = 0.2743, freqC = 0.2862, freqG = 0.1473, freqT = 0.2922 e de substituição de modelos [A-C] = 1.0000, [A-G] = 4.3746, [A-T] = 1.0000, [C-G] = 1.0000, [C-T] = 0.9918 e [G-T] = 1.0000. A proporção de sítios invariáveis (I) foi de I = 0,5032; as taxas de razão transição/transversão foram de $K_1 = 0,34$ (purinas) e $K_2 = 16, 23$ (pirimidinas) e a razão geral de transições/transversões ($R = [A*G*K_1 + T*C*K_2] / [A/G]*[T/G]$) foi de $R = 4,41$.

Ambas as árvores geradas pelas inferências fenética (*neighbor-joining*, Figura 1 A) e cladística (*maximum-likelihood*, Figura 1B) foram congruentes para gerar três grandes clados, que foram denominados aqui como Grupo A, Grupo B e Grupo C.

A reconstrução filogenética de ambas as árvores mencionadas acima posiciona algumas espécies que provavelmente haviam sido identificadas equivocadamente (por exemplo, A.asun-6 e A.asun-8; que correspondem a *A. abramis*) e outras que não foi possível identificar morfológicamente (e.g. A.sp-481 é da espécie *A. altiparanae*). Tendo-se altos valores de *bootstraps* que suportam tais posicionamentos citados acima: 83/70 e 86, respectivamente.

A



Grupo A

Grupo B

Grupo C

B

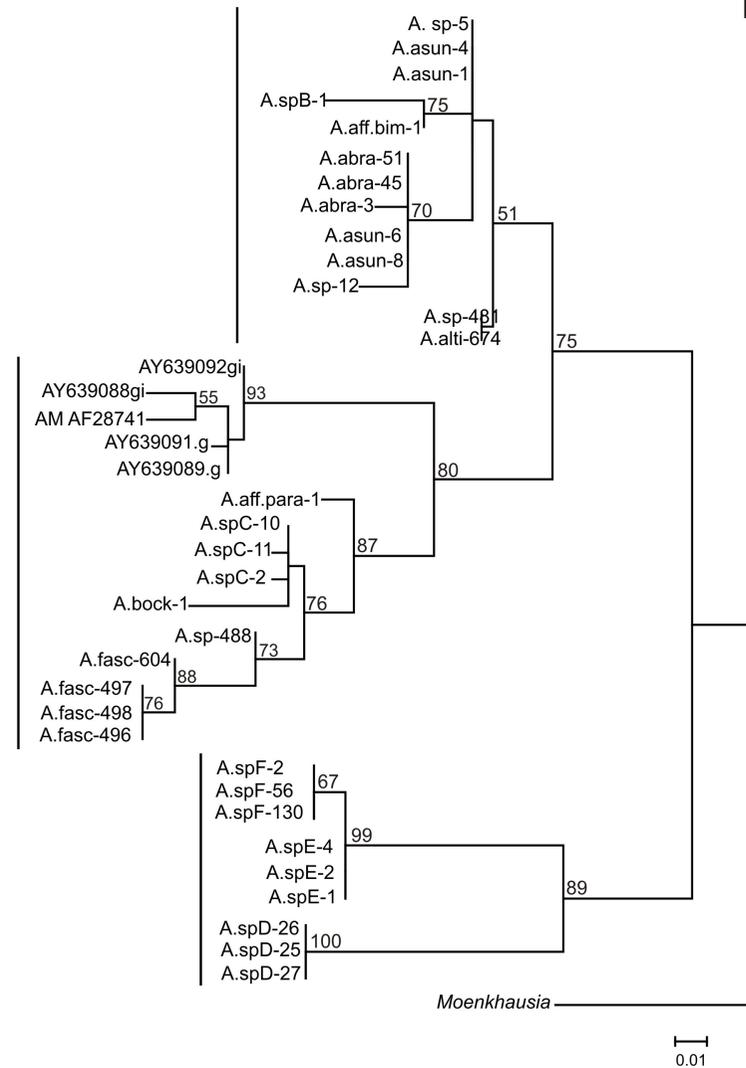


Figura 1. Árvores filogenéticas de união-de-vizinhos (A) e máxima-verossimilhança (B) geradas a partir das seqüências parciais do gene citocromo *b* das espécies mostradas na Tabela 1. Os valores de bootstrap (1.000 repetições) encontram-se nas ramificações dos clados.

Dentro de cada um dos clados menores, denominados aqui como ASU (*A. asuncionensis*), SP-B (*Astyanax* sp. B), aff.BIM (*A. aff. bimaculatus*), ABRA (*A. abramis*), ALTI (*A. altiparanae*), GB(fas/mex: *A. fasciatus* e *A. mexicanus*, das regiões da América Central), aff.PARA (*A. aff. paranae*), SP-C (*Astyanax* sp. C), BOCK (*A. bockmanni*), SP-488 (não-identificado), FASC (*A. fasciatus*), SP-D (*Astyanax* sp. D), SP-E (*Astyanax* sp. E) e SP-F (*Astyanax* sp. F), observou-se baixa variação genética (Tabela 2); ou com índices não computados (N/C) - quando havia apenas um indivíduo compondo o clado - ou com índices menores de 0,007. É exceção, nesse caso, o agrupamento GB(fas/mex), que possui variação de 0,023. Explica-se, porém, o valor mais elevado pelo fato de esse clado ser constituído por espécies haplotípicas (*A. fasciatus* GD/GA/GC/FE) e de uma espécie distinta (*A. mexicanus*) que foram agrupadas juntas aqui, em uma resolução filogenética mais baixa, para generalizar um grupo mais amplo.

Tabela 2. Distância genética (Tamura-Nei) dentro de cada clado

Clados	Distância (d)
1. ASU	0,000
2. SP-B	N/C
3. aff-BIM	N/C
4. ABRA	0,008
5. ALTI	0,000
6. GB(fas/mex)	0,023
7. aff-PARA	N/C
8. SP-C	0,007
9. BOCK	N/C
10. SP-488	N/C
11. FASC	0,005
12. SP-D	0,000
13. SP-F	0,000
14. SP-E	0,000
15. MOENK	N/C

Quando se compararam as distâncias genéticas entre os clados dentro dos grupos A, B e C, notaram-se valores relativamente baixos (Tabela 3). Para exemplificar, dentro do grupo A, a distância mais alta foi encontrada entre os clados ABRA e SP-B (0,074), o restante das combinações possíveis não ultrapassa o valor de 0,047. Desta forma, evidencia-se maior ou menor parentesco entre as espécies dentro de cada um dos três grandes grupos formados.

No grupo A, as menores distâncias genéticas foram entre ASU e aff. BIM (0,015) e ASU e ALTI (0,010). No grupo C, os clados SP-F e SP-E também mostram alto grau de parentesco entre si (distância genética de apenas 0,010). Por outro lado, o clado SP-D tem uma distância grande dos clados SP-E e SP-F (0,154 e 0,165 respectivamente), além de alta divergência da espécie *Astyanax* sp. D em relação às outras duas que compartilham o mesmo agrupamento, com pode ser visto nas Figuras 2 e 3.

Dentro do grupo B foi onde se notou a maior distância genética das análises (entre GB(fas/mex) e BOCK, que foi de 0,148). Isso provavelmente se explica pelo fato dos indivíduos que tiveram suas seqüências adquiridas no *GeneBank* serem de regiões da América Central, pois, vêem-se valores de distância genéticas relativamente baixas quando comparados apenas os indivíduos (clados) das bacias do Brasil. O indivíduo SP-488 não se agrupou em nenhum clado, mas possui menores distâncias com o clado FAS (0,034) e SP-C (0,024) do que com, por exemplo, ABRA (0,160) ou ALTI (0,127) sugerindo que pode ser uma espécie diferente das demais que foram agrupadas devidamente em seus clados, mas que possui mais semelhança com os indivíduos dos clados FAS e SP-C.

Tabela 3. Distância genética (Tamura-Nei) entre os clados. A letras entre parênteses correspondem ao grupo que os clados se agruparam (A=Grupo A; B= Grupo B. C= Grupo C)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 ABRA	(A)	-													
2 ALTI	(A)	0,036	-												
3. ASUN	(A)	0,025	0,010	-											
4. FASC	(B)	0,198	0,157	0,163	-										
5.GB(fas/mex)	(B)	0,154	0,126	0,141	0,119	-									
6. aff-BIM	(A)	0,041	0,026	0,015	0,158	0,163	-								
7. aff-PARA	(B)	0,135	0,103	0,103	0,070	0,113	0,123	-							
8. SP-488	(B)	0,160	0,127	0,127	0,034	0,115	0,147	0,042	-						
9. BOCK	(B)	0,180	0,145	0,145	0,068	0,148	0,151	0,047	0,052	-					
10. SP-B	(A)	0,074	0,047	0,047	0,158	0,170	0,031	0,135	0,148	0,151	-				
11. SP-C	(B)	0,152	0,118	0,118	0,040	0,120	0,124	0,035	0,024	0,034	0,124	-			
12. SP-D	(C)	0,191	0,173	0,190	0,251	0,183	0,213	0,216	0,244	0,262	0,216	0,244	-		
13. SP-E	(C)	0,177	0,170	0,177	0,214	0,210	0,199	0,172	0,180	0,213	0,219	0,199	0,154	-	
14. SP-F	(C)	0,172	0,164	0,172	0,208	0,204	0,193	0,167	0,174	0,207	0,214	0,194	0,165	0,010	-

Dentro dos três grandes clados verificou-se diversidade genética de 0,023; 0,064 e 0,070 nos grupos A, B e C, respectivamente (Tabela 4) e, quando analisadas as distâncias genéticas entre esses grupos, os valores colocam o Grupo A mais próximo do Grupo B (0,122) e mais distante do Grupo C (0,159).

Tabela 4. Distância genética (Tamura-Nei) dentro de cada grupo

	d
Grupo A	0,023
Grupo B	0,064
Grupo C	0,070

A maior distância entre esses grupos foi verificada entre os Grupos B e C, que foi de 0,185 (Tabela 5). Essas distâncias são melhor vistas no gráfico de dispersão (Figura 2), onde as distâncias Tamura-Nei emparelhadas em escalas dimensionais geraram os respectivos valores de auto-vetores.

Tabela 5. Distância genética (Tamura-Nei) entre os grupos.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Grupo A	-	-	-
Grupo B	0,122	-	-
Grupo C	0,159	0,185	-

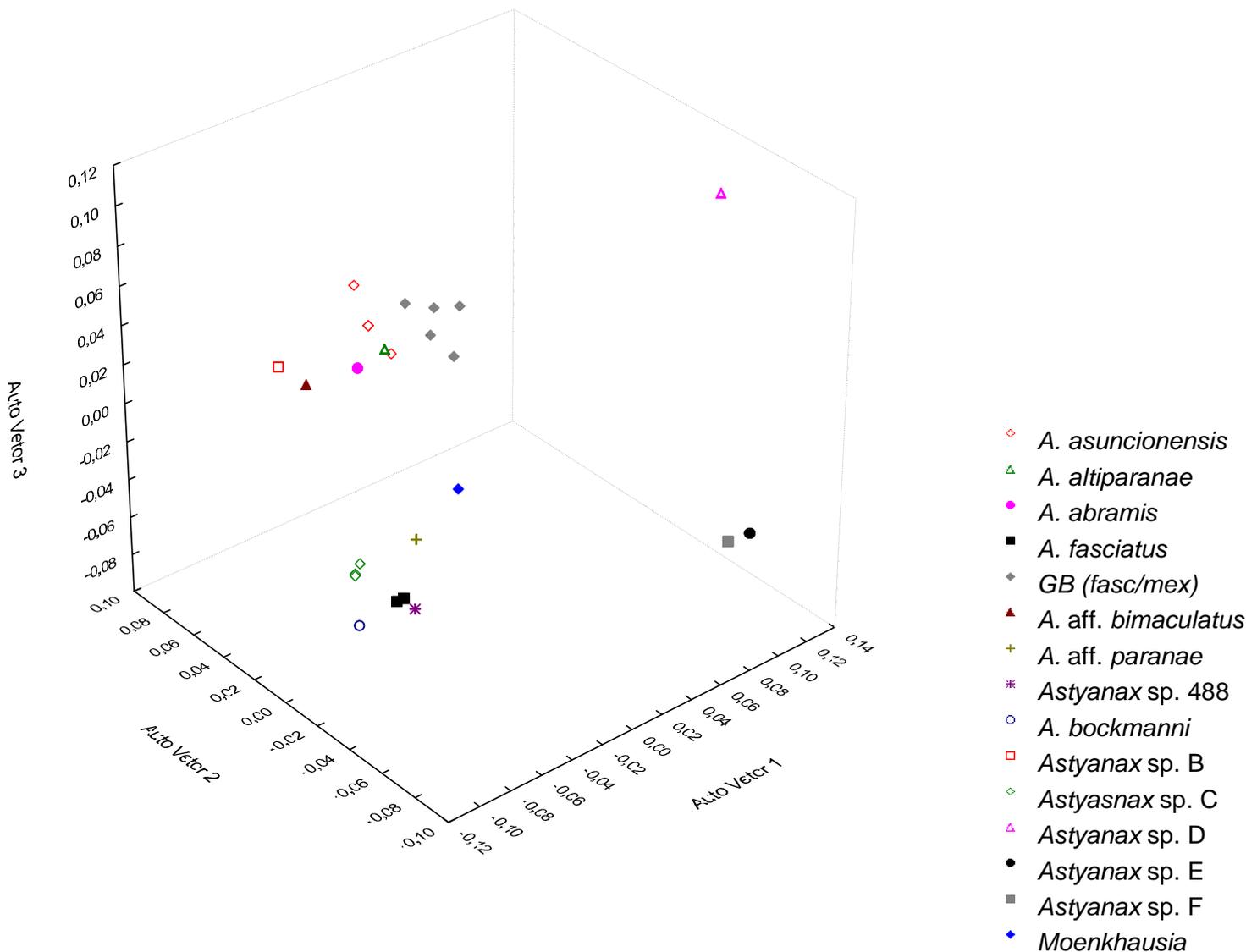
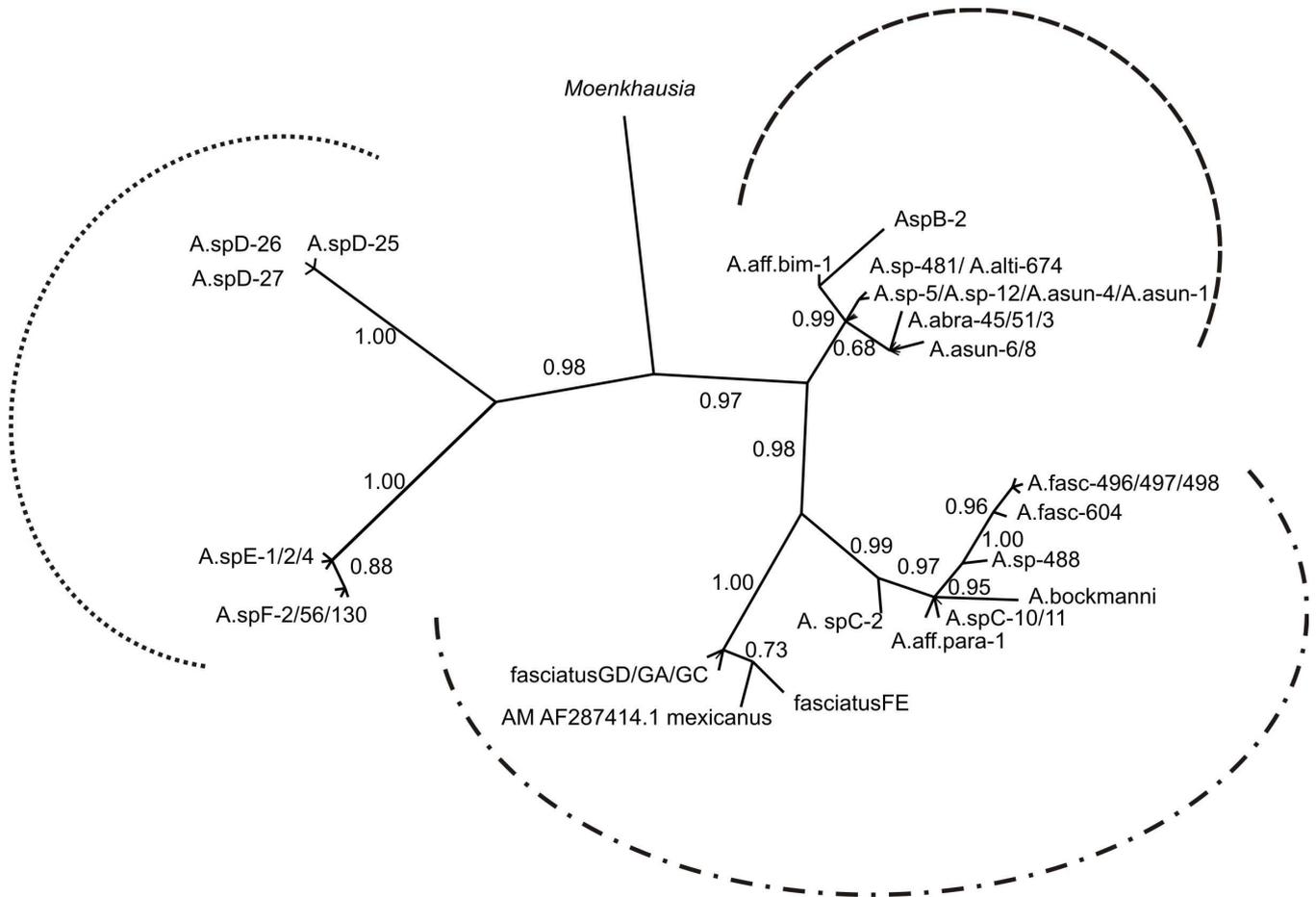


Figura 2. Gráfico 3D de dispersão em coordenadas principais (auto-vetores 1, 2 e 3) de espécies de *Astyanax* e do grupo externo *Moenkhausia*.

Com relação às probabilidades *a posteriori*, a árvore gerada pela inferência bayesiana (Figura 3) também demonstra visualmente essas distâncias vistas no gráfico de dispersão (Figura 2) e explicitadas na tabela de distância genética entre esses três grandes grupos (Tabela 5). Além disso, apresenta altos valores de probabilidades posteriores, ou seja, a tendência das ramificações geradas quando se supõe um grande número de gerações posteriores possuem valores acima e 97% nas ramificações que sustentam os clados de maior pertinência.



0.1

Figura 3. Árvore filogenética bayesiana gerada sob as simulações das Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo (MCMC). Os semicírculos pontilhados (...), tracejados (___) e tracejado-pontilhados (-.-.-) correspondem aos grupos C, A e B, respectivamente. Os valores nas ramificações geradas correspondem a porcentagem da probabilidade posterior das últimas 280.000 gerações simuladas segundo o modelo de substituição nucleotídica TrN+I.

DISCUSSÃO

Com o presente estudo filogenético pode-se sugerir que os *Astyanax* do rio Iguaçu não se diversificaram a partir de um único ancestral que ficou isolado quando a bacia se formou, sugerindo a possibilidade de pelo menos três grupos de *Astyanax* terem ficado isolados durante a formação da bacia. Tais grupos foram denominados aqui como Grupos A, B e C, reforçando hipóteses de que *Astyanax* representa um grupo de complexa identificação, como vistos em estudos morfológicos (e.g. Weitzman & Malabarba, 1998) e de abordagens genéticas (e.g. Calcagnotto *et al.* 2005; Porter *et al.* 2007).

No grupo C, que agrupa as espécies *Astyanax* sp. F, *Astyanax* sp. E e *Astyanax* sp. D, há uma distância genética alta dessa última espécie em relação aos outros dois agrupamentos - 0,165 e 0,154, respectivamente (Tabela 3). A diversidade genética dentro deste grande grupo também foi a maior dos três grandes grupos formados, ou seja, 0,070 (Tabela 4). Isso sugere que os clados formados por *Astyanax* sp. F e *Astyanax* sp. E tendem a divergir de *Astyanax* sp. D, como pode ser melhor observado na Figura 3. Esse tipo de análise, que tem inferência bayesiana, mostra um alto valor de probabilidade *a posteriori* (98%) para a ramificação entre esses dois sub grupos, que simula a tendência filogenética de futuras gerações.

A posição e distância genética de *Astyanax* sp. D em relação aos dois clados citados anteriormente, sugerem que a separação dessa espécie dos grupos ancestrais que deram origem às espécies agrupadas no Grupo C se deu num passado mais distante, enquanto *Astyanax* sp. F e *Astyanax* sp. E teriam uma diferenciação mais recente (dentro do Grupo C), o que se confirma com a baixa distância genética entre essas duas espécies, que foi de apenas 0,010. Kanteak (2005) levantou a hipótese que as inversões e padrão de heterocromatina observadas em cromossomos de *Astyanax* sp. D teriam sido decorrentes de fenômenos geológicos que teriam dividido a espécie em várias populações isoladas entre si, permitindo, deste modo, diferenciações ao nível heterocromático. Em algum momento da história evolutiva recente da espécie, essa barreira teria desaparecido e os indivíduos das várias localidades voltaram a se cruzar, impedindo a ocorrência de um evento de especiação.

Tais suposições corroboram-se às mudanças climáticas que ocorreram durante o Período Quaternário, que influenciaram a distribuição da cobertura vegetal na região da bacia do rio Iguaçu. Elas teriam causado, em períodos glaciais curtos, expansões e retrações sucessivas, tanto das florestas, quanto das áreas de vegetação aberta. Durante os períodos glaciais, ocorreu a expansão dos núcleos de aridez e semi-aridez e conseqüente retração das florestas. Nos períodos interglaciais, porém, ocorreu expansão das florestas e retração das

áreas áridas (Van Der Hammem, 1974; Ab'saber, 1977; Bigarella & Andrade-Lima, 1982). Com a expansão das florestas, aumento da precipitação e diminuição das áreas áridas, o rio Iguaçu teria se tornado menos severo para estes organismos e, assim, as populações anteriormente separadas teriam tornado a se cruzar (Kantek, 2005).

Devido ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, ocorrido há aproximadamente 22 milhões de anos (Período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da bacia do rio Iguaçu foram isoladas por quedas que apresentam até cerca de 70m de desnível (Maack, 1981). Tal fato teria favorecido um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna. Tomando-se em conta esses dados geológicos, pode-se sugerir que *Astyanax* sp D teria se isolado reprodutivamente num pretérito mais longínquo do que as espécies *Astyanax* sp E e *Astyanax* sp F, devido, provavelmente, à especificidade de habitat da primeira espécie em questão.

Essas mudanças paleoclimáticas teriam causado a interrupção da distribuição geográfica contínua de muitos táxons por meio da alteração de vários fatores limitantes à distribuição, tais como alteração do nível d'água, temperatura e composição química da água. A fragmentação de áreas de distribuição geográfica teria repercutido no isolamento de várias de suas populações. Isto teria criado condições propícias para diferenciações locais e até mesmo especiações, dependendo do tempo geológico envolvido (Bigarella & Andrade-Lima, 1982; Weitzman & Weitzman, 1982; Lucinda, 1995).

No grupo B, vêem-se dois grupos distintos de *Astyanax fasciatus* (Figs. 1A, 1B e 2): o mais basal, proveniente do rio Tibagi, da bacia hidrográfica do alto rio Paraná e o clado superior com haplótipos de regiões das bacias da América Central, além de um exemplar de *A. mexicanus* da região do México. Os índices que suportam a separação destes clados em ambas as árvores filogenéticas (Figura 1) geradas têm altos valores de *bootstrap* (75 e 80) nas análises de união-de-vizinhos e máxima-verossimilhança, respectivamente. A distância genética alta (0,119) entre os grupos corrobora que *A. fasciatus* é, na verdade, um complexo de espécies. A espécie *A. mexicanus* aparecendo como grupo irmão de *A. fasciatus* provenientes da América central está em congruência com os resultados de Strecker *et al.* (2004) e Porter *et al.* (2007).

Melo (2005) salienta que somente os espécimes provenientes da bacia do rio São Francisco, local de onde o material tipo dessa espécie foi primeiramente coletado (Eigenmann, 1921), devam ter a denominação *A. fasciatus*, uma vez que se vêem diferenças morfológicas em relação às outras espécies do complexo que ocorrem, por exemplo, no alto curso do rio Paraná e no rio Paraíba do Sul (Melo, 2001). Os exemplares de outras bacias na

verdade seriam, segundo o último autor citado, espécies crípticas do “complexo de espécies *A. fasciatus*”, ou ainda, outras espécies. Dados citogenéticos também confirmam a plasticidade de organismos que são identificados como *A. fasciatus*, já que é possível identificar três citótipos padrão com base no pareamento dos cromossomos homólogos, sendo $2n=46$, 48 e 50, com pequenas diferenças cariotípicas populacionais dentro de cada citótipo (Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006; Kavalco, 2008;).

Em relação aos dois clados de *A. fasciatus* analisados aqui, há estudos que levantam o tempo de divergência para esses grupos. Porter *et al.* (2007), baseando-se em calibragem do gene citocromo *b*, sugerem que a divergência de *A. mexicanus* na América Central tenha se iniciado há cerca de 5-2 Ma (Plioceno), que é o grupo irmão de *A. fasciatus* daquela região. Strecker *et al.* (2004) defendem a hipótese que a média de divergência para os *A. fasciatus* (também da América Central) é de 3,1 Ma, que corresponderia à conclusão da formação do Istmo do Panamá há cerca de 3 Ma (Bussing, 1985; Myers, 1966). Tal fato teria permitido *A. fasciatus* ser capaz de invadir a América Central depois do fechamento terrestre; fato que também é assumido para outros peixes de água doce (Bermingham & Martin, 1998; Perdices *et al.*, 2002). Kavalco (2008) também sugeriu um tempo de divergência para *A. fasciatus*, desta vez para os provenientes da bacia do alto rio Paraná (entre outras localidades). Neste estudo, tal espécie se situa em um clado que teria uma divergência estimada de 4,3 Ma. Além disso, a mesma autora também realizou análises filogenéticas com o gene *ATPase6/8*, o qual se mostrou pouco variável, sugerindo, também, uma separação recente para esse grupo. Baseando-se nesses dados, pode-se inferir que as espécies da bacia do alto rio Paraná são de uma linhagem mais antiga do que os espécimes do mesmo táxon das regiões da América Central.

Um estudo de Pazza *et al.* (2006) ressaltou, por meio de dados gerados por padrões cromossômicos, que os exemplares da bacia do Alto rio Paraná podem fazer parte de um grupo mais diverso de peixes que estão organizados sob um mesmo gênero, o que sustentaria a idéia de uma divergência relativamente antiga. No gráfico de dispersão de auto-vetores (Figura 2) e nas árvores filogenéticas (Figuras 1 e 3), pode-se notar que mesmo entre os quatro exemplares amostrados, um deles (fasc-604) é mais distante dos outros três indivíduos sob a mesma nomenclatura, o que sugere que pode ser um haplótipo distinto que demonstra, por sua vez, que mesmo numa amostra pequena é notada variação intraespecífica acentuada.

Na pesquisa de Pazza *et al.* (2006), também é salientada a semelhança dos padrões de distribuição dos genes de rDNA 5S, que são compartilhados entre *A. aff. fasciatus* e *A. bockmanni*. O grupo B desse estudo comporta *A. fasciatus* e *A. bockmanni*, corroborando,

assim, a semelhança sugerida no estudo acima. No entanto, Kavalco (2008) ressalta a dificuldade de se inferir relações evolutivas acerca desta espécie (*A. bockmanni*), uma vez que, mesmo compartilhando genes de rDNA 5S em posição intersticial num cromossomo M com *A. fasciatus*, *A. bockmanni* não apresenta DNA satélite As-51, que é notado nos citótipos da espécie anterior. Esse impasse para relacionar *A. bockmanni* com robustez para com outros táxons também é notado no presente estudo, pois mesmo tendo certa proximidade com *A. fasciatus* (0,068) e *Astyanax* sp. C (0,034) a espécie em questão se encontra num ramo evolutivo divergente de tais grupos, como pode ser melhor visto na árvore bayesiana (Figura 3).

Ainda em relação ao Grupo C, vê-se a maior proximidade genética da espécie *Astyanax* sp C com *A. bockmanni* (distância genética de 0,034) com valores altos de *bootstrap* nas árvores filogenéticas união-de-vizinhos (83) e máxima-verossimilhança (76) (vide Tabela 3 ou Figura 2). Kavalco (2008), levantando o provável tempo de divergência para *A. fasciatus* e *A. bockmanni*, sugere um tempo de 4,3 Ma.

De acordo com Lundberg *et al.* (1998), no período Mioceno médio (20 -11,8 Ma), o platô Sul-americano sofreu estresse compressivo no sudeste brasileiro, que teria resultado no soerguimento da “estrutura Arujá” (Riccomini, 1989), que eventualmente separou as drenagens do Tietê e Paraíba do sul. Ao oeste, um novo sistema fluvial foi estabelecido com a direção atual leste-oeste para o presente rio Tietê (Coimbra *et al.*, 1983). Ao leste, a reorganização da drenagem do Paraíba do Sul encontrou um período de erosão durante o tempo de atividade tectônica no Plioceno-Pleistoceno, provavelmente num ambiente mais quente e úmido (Lunderberg *et al*, 1998). Tais processos evidenciam que a divergência das espécies *A. fasciatus* e *A. bockmanni* é mais recente do que a separação de *Astyanax* sp. C dos grupos ancestrais que teriam dado origem aos organismos do grupo B, uma vez que esta última espécie, do rio Iguaçu, teria se isolado das bacias adjacentes num passado mais longínquo (Mioceno).

No Grupo A, a tendência observada é que as espécies agrupadas aqui fazem parte do “complexo de espécies *A. altiparanae-bimaculatus*” que, segundo Kavalco (2008), compartilham características citogenéticas semelhantes, como traços simplesiomórficos já vistos anteriormente em Characidae (Scheel, 1973; Morelli *et al.*, 1983; Portela *et al.*, 1988; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001; 2005), e o número diplóide de 50 cromossomos (Pazza & Kavalco, 2007). Ingenito *et al.* (2004) também ressaltam a alta similaridade de aspectos morfológicos (mais especificamente, a coloração) entre *A. aff. bimaculatus* e *A. abramis* que no presente estudo se agrupam no mesmo grande clado que comporta *A.*

asuncionensis e *A. altiparanae*. Tais semelhanças já haviam sido vistas por Eigenmann (1921) que, inclusive, teria agrupado as espécies *A. abramis*, *A. asuncionensis* (que hoje são reconhecidas como espécies válidas) como subespécies de *A. aff. bimaculatus*. O posicionamento de *A. altiparanae* também está de acordo com estudos anteriores (Graça & Pavanelli, 2002; Prioli *et al.*, 2002), que ressaltam essa espécie como uma designação recente dada às populações do alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (Garutti & Britski, 2000). A distância genética baixa (0,026, Tabela 3) entre essas duas espécies (ALTI x aff. BIM) também sugere uma divergência mais recente.

A separação relativamente recente dos clados agrupados no Grupo A pode estar relacionada ao “padrão C” de padrões de distribuição do trabalho de Ribeiro (2006). Segundo este autor, a categoria de divisão mais recente dos padrões de distribuição de espécies de peixes de água doce reflete os eventos vicariantes mais recentes entre os escudos cristalinos de rios e as drenagens adjacentes costeiras que levaram ao reconhecimento de espécies compartilhadas entre elas. Ativas áreas tectônicas ocorridas num período mais recente que 1,6 Ma (Saaid *et al.*, 2002) teriam feito possível o compartilhamento da fauna ictiológica das bacias centro-sul com as drenagens costeiras, ressaltando-se as áreas que incluem as cabeceiras do rio Ribeira de Iguape, Iguazu e Paranapanema, além da porção do alto rio Tietê.

Durante os períodos Pleistoceno e Holoceno, a costa sul-americana sofreu transgressões marinhas e flutuações no nível do mar. Estudos sobre o Quaternário brasileiro (Saadi, 1993; Riccomini & Assumpção, 1999; Saadi *et al.* 2002; Ribeiro, 2006) ressaltam que a Fissura Continental do Sudeste Brasileiro (CRSB) teve pronunciada atividade e reativações de estruturas geomorfológicas ancestrais que teriam gerado novas falhas. Essas mudanças topográficas relativamente recentes teriam resultado na reativação de crostas litológicas anciãs descontínuas, além dos rearranjos fluviais causados por esses processos geológicos. Na família Characidae, há o exemplo dos membros da subfamília Glandulocaudinae, tribo Glandulocaudini que têm, no gênero *Mimagoniates*, maior diversidade específica (seis espécies) e distribuição mais ampla ao longo das drenagens costeiras. Por outro lado, seu grupo irmão, do gênero *Glandulocauda* (duas espécies), que é primitivo em atributos morfológicos, é endêmico ao escudo cristalino do sul do Brasil, mais especificamente nos rio Tietê e alto Iguazu (Weitzman *et al.*, 1988; Weitzman & Menezes, 1998).

Uma das características geológicas mais proeminentes no sudeste do Brasil foi a formação do Arco de Ponta Grossa, que se consistiu de um soerguimento do embasamento cristalino da porção sudeste da bacia do Paraná (Petri & Fulfaro, 1983) que teria provocado a aceleração do dinamismo fluvial entre os sistemas de drenagens adjacentes, acelerando o

intercâmbio ictiofaunístico entre elas. Movimentos verticais entre os blocos fraturados e evolução erosiva dos rios ao longo de tais clivagens teriam promovido uma mistura entre as drenagens adjacentes que explicaria, por exemplo, as trocas ictiológicas que ocorreram entre o rio costeiro Ribeiro de Iguape e os rios Iguaçu e Paranapanema (Ribeiro, 2006).

O mesmo levantamento tectônico pode ser responsável por mandar de volta para a bacia do Alto Paraná uma biota aquática que uma vez estava associada às drenagens costeiras baixas durante uma fase erosiva e tectônica intermediária. De fato, a idéia do sudeste do Brasil ser uma área ativa tectonicamente e propensa a sofrer deformações (Cobbold *et al.*, 2001) é fortemente suportada por estes complexos padrões de distribuição incluídos no “padrão C” de Ribeiro (2006). A intensa atividade tectônica ao longo da fissura continental do sudeste brasileiro também explicaria o porquê da bacia do Paraná contribuir mais (em termos de estoques ancestrais) para o desenvolvimento de faunas ictiológicas, como foi mencionado por Bizerril (1994). No entanto, há teorias que propõem que a diversificação da fauna dos rios de drenagens costeiras da América do Sul também está relacionada às mudanças do nível no mar durante o Pleistoceno tardio (Weitzman *et al.*, 1988), que levanta a hipótese de que, quando o nível no mar era em torno de cem metros mais baixo que hoje, a fauna ictiológica foi capaz de se tornar mais dispersiva e, seguindo-se um levantamento do nível marítimo, a especiação teria ocorrido dentro de bacias de rios isoladas. É, pois, nesse período que ocorrem as oscilações da pressão aquática ao longo da plataforma relacionada a mudanças no nível do mar (Almeida & Carneiro, 1998; Riccomini & Assumpção, 1999; Cobbold *et al.*, 2001; Riccomini *et al.*, 2004).

O relevo atual do centro-sul brasileiro começa efetivamente a ser definido no limite Mioceno/Plioceno, com a formação de uma grande bacia de drenagem que envolvia as bacias do Paraná, Uruguai e Paraguai (King, 1956; Maack, 1968). Durante o Plioceno Médio ocorre o soerguimento da serra de Maracaju (Fulfaro & Suguio, 1974), que vem a constituir o divisor das bacias Paraná e Paraguai. O canal atual do rio Paraná, escavado nos resistentes paredões do arenito Caiuá, instala-se provavelmente no início do Quaternário (Stevaux, 1994). Tais dados geomorfológicos corroboram-se às inferências de divergência relativamente recente sugeridas por distâncias genéticas baixas (0,010) entre as espécies da bacia do Paraguai (ASU) e da bacia do rio Paraná (ALT); e destas com o clado composto, em sua maioria, com espécimes provindos da bacia do rio Cuibá/Manso (ABRA), com distâncias genéticas de 0,025 (ABRA x ASU) e 0,036 (ABRA x ALTI).

Baseado nos dados geológicos mostrados acima se pode inferir que a diferenciação de *Astyanax* sp. B, assim como as outras espécies endêmicas do rio Iguaçu discutidas aqui, teria

ocorrido num passado mais remoto, quando comparadas às prováveis especiações entre o restante das espécies dentro do Grupo A (e das outras espécies endêmicas do Iguazu, em seus respectivos grupos). Uma vez que as distâncias genéticas entre *Astyanax* sp. B, quando comparadas com o restante dos outros clados do Grupo A, são mais altas do que quando se comparam as outras espécies em questão entre si, que não mostram valores maiores do que 0,041 (e.g. ABRA x aff. BIM, Tabela 3).

Kantek *et al.* (2008), trabalhando com as espécies *Astyanax* sp. B., *Astyanax* sp. C e *Astyanax* sp. D, corroboram as divergências de tais espécies vistas no presente estudo. A grande distância entre *Astyanax* sp. D com as demais espécies do rio Iguazu está em congruência com os dados destes autores, uma vez que ressaltam que *Astyanax* sp. D difere de *Astyanax* sp. B e *Astyanax* sp. C sob abordagens cromossômicas específicas. Não obstante, os dados que Kantek *et al.* (2008) geraram em relação aos padrões de sítios 5S rDNA reforçam a diferenciação entre estas três espécies discutidas, uma vez que *Astyanax* sp. B pode ser claramente diferenciada destas outras duas espécies por apresentar um cromossomo metacêntrico portando *locus* de rDNA 5S, que não está presente em *Astyanax* sp. C e *Astyanax* sp. D. Além disso, a presença destes sítios específicos em cromossomos metacêntricos também são observados em outras espécies de *Astyanax*; entre elas a espécie *A. altiparanae*, que no presente estudo ficou agrupada no mesmo grande grupo que *Astyanax* sp. B (Grupo A).

Sendo o gênero *Astyanax* um grupo complexo, com histórias evolutiva e biogeográfica não esclarecidas por inteiro, faz-se necessário o aumento de estudos que incitem a discussão e agregação de dados para o afloramento de novas idéias e hipóteses para o melhor entendimento deste táxon. O presente estudo contribui para o estabelecimento de algumas relações entre algumas espécies, principalmente sobre a origem dos *Astyanax* do rio Iguazu, que já vinham sendo discutidas em trabalhos anteriores, e direciona novas linhas de abordagens para a melhor compreensão das nebulosas relações filogenéticas e biogeográficas implícitas na evolução deste grupo ictiológico. Os dados levantados aqui estão à disposição para gerar corroborações e/ou contrariedades que dêem maior robustez na compreensão taxonômica e evolutiva dos lambaris das bacias brasileiras e sul-americanas. Não obstante, esses dados deixam a sugestão da importância da união de dados geomorfológicos (tais como evoluções litológicas e hidrográficas das bacias sobre as quais a fauna a ser estudada se estabeleceu) aos estudos de evolução biológica dos organismos que ali vivem, como bem levantou Leopold *et al.* (1964), ao afirmarem que “um rio deve ser melhor pensado como tendo uma herança do que uma origem”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber, N.A. 1977. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas*, 3: 1-11.
- Agostinho, A. A. & L. C. Gomes. 1997. Manejo e monitoramento de recursos pesqueiros: perspectivas para o reservatório de Segredo In: Agostinho, A. A & L. C. Gomes (eds) Reservatório de Segredo: Bases Ecológicas para o Manejo. EDUEM, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil, Pp 319-364.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19:716–723.
- Almeida, F. F. M. & C. D. R. Carneiro. 1998. Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências*, 28(2): 135–150.
- Artoni, R. F., O. A. Shibatta, M. C. Gross, C. H. Schneider, M. C. Almeida, M. R. Vicari & L. A. C. Bertollo, L. A. C. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, 4(2): 197-202.
- Azpelicueta, M. M., A. E. Almiron & E. J. R. Casciotta. 2002. *Astyanax paris*: A new species from the Rio Uruguay basin of Argentina (Characiformes, Characidae). *Copeia*, 4: 1052–1056.
- Azpelicueta, M. M., J. M. Mirande, A. E. Almiron & E. J. R. Casciotta. 2003. A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from Paraná river basin in Argentina. *Revista del Museo de La Plata, Zoología*, 15(166): 1–12.
- Bermingham, E. & A. P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7: 499–517.
- Bertaco, V. A. & P. H. F. Lucinda. 2005. *Astyanax elachylepis*, a new characid fish from the rio Tocantins drainage Brazil (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 3(3): 389–394.
- Bertaco, V. A & C. A. S. Lucena. 2006. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 4:53-60.
- Bigarella, J. J. & D. Andrade-Lima. 1982. Paleoenvironmental changes in Brazil. In: International Symposium of ghe Association for Tropical Biology. Caracas. Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology. New York: Columbia University Press, p. 27-40.
- Bizerril, C. R. S. F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldensia*, 16(1): 51–80.

Britski, H. A. 1972. Peixes de água doce de São Paulo: sistemática. In: Poluição e Piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, Pp. 79-108.

Britski, H. A., Y. Sato & A. B. S. Rosa. 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª ed. Minas Gerais> Ministério da Irrigação – CODEVASP, 115 p.

Britski, H. A., Y. Sato & A. B. S. Rosa. 1998. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASP.

Britski, H. A., K. Z. S. Silimon & B. S. Lopes. 2007. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 227 Pp.

Bussing, W. A. 1985. Patterns of distribution of the Central American Ichthyofauna. In: Stehli, F.G., Webb, S.D. (Eds.), The Great American Biotic Interchange, Plenum Press, New York, 4: 453–473.

Calcagnotto, D., S. A. Schaefer & R. DeSalle. 2005. Relationship among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular and Phylogenetics and Evolution*, 36: 135-153.

Casciotta, J. R., A. E. Almiron & M. M. Azpelicueta. 2003. A new species of *Astyanax* from rio Uruguay basin, Argentina (Characiformes: Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14(4): 329–334.

Cobbold, P. R., K. E. Meisling & V. S. Mount. 2001. Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 85(11): 1925–1944.

Coimbra, A. M., C. Riccomini & M. S. Melo. 1983. A Formação Itaquaquetuba: evidências de tectonismo no quaternário paulista. *Simpósio Regional de Geologia*, 4, São Paulo, Atas, p. 253-266.

Daniel-Silva, M. F. Z. & L. F. Almeida-Toledo. 2001. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia*, 209-215.

Daniel-Silva, M. F. Z. & L. F. Almeida-Toledo. 2005. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of *Astyanax*. *Cytogenetic Genome Research*, 109: 497-501.

Domingues, M. S. 2005. Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 do alto rio Tibabi e alto rio Iguaçu. Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 66 p.

Domingues, M. S., M. R. Vicari, V. Abilhoa, J. P. Wamser, M. M. Cestari, L. A. C. Bertollo, M. C. Almeida & R. F. Artoni. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two

allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, 5(1): 37-44.

Eigenmann, C. H. 1921. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, Massachusetts*, 23 (3): 209-310.

Fink, S. V. & W. L. Fink. 1981. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 72(4); 297-353.

Fulfaro, V. J. & K. Suguio. 1974. O Cenozóico paulista: gênese e idade. In: congresso Brasileiro de Geologia, 28. Anais. Porto Alegre, p. 91-101.

Futuyma, D. 1986. *Evolutionary Biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2nd Edition.

Futuyma, D. 1986. *Evolutionary Biology* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2nd Edition.

Garavello, J. C., C. S. Pavanelli, & H. I. SUZUKI. 1997. Caracterização da ictiofauna do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A. A. & L. C. GOMES. *Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo*. Maringá: EDUEM. p. 61-84.

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

Goodland, R. 1975. Usina Hidrelétrica Foz do Areia: reconhecimento do impacto ambiental. Curitiba, COPEL.

Graça, W. J. & C. S. Pavanelli. 2002. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. *Acta Scientiarum*, 24(2): 451-453.

Graça, W. J. & C. S. Pavanelli. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá : EDUEM. 241p.

Greenwood, P. H. 1984. African chichlidis and evolutionary theories. Pp. 141-154. In: Echelle, A. A. & I. Kornfield (eds). *Evolution of fish species flocks*. Univ. Maine Press, Orono.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analisis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, (41): 95-98.

Haluch, C. F. & V. Abilhoa. 2005. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3(3): 383-388.

Hashimoto, D. T., V. R. Gonçalves, J. Bortolozzi, F. Foresti & F. Porto-Foresti. 2008. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 275-278.

- Higgins, D. G., J. D. Thompson & T. J. Gibson. 1996. Using CLUSTAL W for multiple sequences alignment. *Methods in Enzimology* (266): 383-402.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Ingenito, L. F. S., L. F. Duboc & V. Abilhoa. 2004 Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR*, 7(1): 23-36.
- Kantek, D. L. Z., A. S. Fenocchio & M. M. Cestari. 2003. Cytogenetic Characterization and NOR Polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from First Plateau of Iguaçu River (Paraná State, Brazil). *Cytologia*, 68(1): 19-24.
- Kantek, D. L. Z. 2005. Estudo citogenetico comparativo entre populacoes de uma espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) endêmica do rio Iguaçu. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 70p.
- Kantek, D. L. Z., R. R. Cipriano, R. B. Noleto, A. S. Fenocchio, R. F. Artoni & M. M. Cestari. 2008. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguacu river. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 239-242.
- Kantek, D. L. Z., R. B. Noleto, F. A. M. Maurutto, L. A. C. Bertollo, O. Moreira-Filho & M. M. Cestari. 2008. Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguaçu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. *Journal of Fish Biology*, 73: 2012-2020.
- Kavalco. K. F. 2008. Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. 197 Pp.
- King, L. C. 1956. A geomorfologia do Brasil Oriental. *Revista Brasileira de Geografia*, 18(2): 3-48.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch & A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA procedure. *Nucleic Acids Research*, (19): 4293.
- Legendre, P. & M. J. Anderson. 1998. Program DistPCoA. Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Québec.
- Leopold, L. B., M. G. Wolman & J. P. Miller. 1964. Fluvial processes in Geomorphology. W, H. Freeman, San Francisco, 522Pp.
- Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. P. Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C.S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Cassati, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris, Jr. (eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, Pp. 106-169.

- Lima, F. C. T. & J. Zuanon. 2004. A new species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) from the rapids of the lower rio Xingu, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 2(3): 117–122.
- Lowe-McConnell, R. 1975. *Fish Communities in Tropical Freshwaters*. Longman Publishing, New York.
- Lucena, C. A. S. 1993. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Unpublished doctoral thesis. Universidade de São Paulo – SP.
- Lucinda, P. H. F. 1995. Estudo taxonômico dos peixes *Cyprinodontiformes* da bacia do rio Iguaçu. Curitiba. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.
- Lundberg, J. G., L. G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M. C. S. L. Malabarba & F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. Pp 13–48. *In*: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Maack, R. 1968. *Geografia física do Paraná*. Curitiba : Secretaria da Cultura e do Esporte. Ed. Jose Olimpo, 450 Pp.
- Maack, V. 1981. *Geografia física do Estado do Paraná*. Rio de Janeiro, Livraria José Olympio, Ed., 442p.
- Medrado, A. S., A. V. A. Figueiredo, A. M. Waldschmidt, P. R. A. M. Affonso & P. L. S. Carneiro. 2008. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology*. 31(1) 208-214.
- Melo, F. A. G. 2001. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei : Characiformes : Characidae) da região da Serra dos Órgãos). *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, 59:1-46.
- Melo, F. A. G. 2005. Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro. 269 p.
- Melo, F. A. G. & P. A. Buckup. 2006. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei, Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 4:45-52.
- Meyer, A., T. D. Kocher, P. Basasibwaki & A. C Wilson. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347: 550-553.
- Meyer, A. 1993. Phylogenetics relationships and evolutionary processes in East African cichlids fishes. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 279-284.

Ministério das Minas e Energias (MME). 1990. Diagnóstico e Planejamento da Utilização dos Recursos Hídricos da Bacia do Iguaçu. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais, 1: 33Pp.

Monesi, N., M. Jacobs-Lorena, M. L. Paçó–Larson. 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 10, 559-569.

Morelli, S., L. A. C. Bertollo, F. Foresti, O. Moreira-Filho & S. A. Toledo-Filho. 1983. Cytogenetic consideration on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia*, 36: 235-244.

Moysés, C. B. & L. F. Almeida-Toledo. 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.

Myers, G. S. 1966. Derivation of the freshwater fish fauna of Central America. *Copeia*, 4: 766–773.

Nelson, J. S . 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, New York.

Orti, G. & A. Meyer. 1997. The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46(1): 75-100.

Pazza R, K. F. Kavalco & L. A. C. BERTOLLO. 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 Genome Research*, 112: 313-319.

Pazza, R. & K. F. Kavalco. 2007. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *The Nucleus*, 50(3): 519-543.

Pazza, R., K. F. Kavalco., S. M. A. P. Prioli., A. J. Prioli & L. A. C. Bertollo. 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical and Systematics Biology*, 35: 843-851.

Perdices, A., E. Bermingham, A. Montilla & I. Doadrio. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 25: 172–189.

Petri, S. & V. J. Fulvaro. 1983. *Geologia do Brasil*. São Paulo, Edusp, 631p.

Portela, A. L. B. S., P. M. Galetti Jr. & L. A. C. Bertollo. 1988. Consideration on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae), *Genetic Molecular Biology*, 11: 307-316.

Porter, M. L. K., Dittmar & M. Pérez-Losada. 2007. How long does evolution of the troglomorphic form take? Estimating divergence times in *Astyanax mexicanus*. *Acta Carsologica*, 36: 173-182.

- Posada, J. L. & K. A. Crandal. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, (14): 817-818.
- Prioli, S. M. A. P., A. J. Prioli, H. F. Júlio Jr., C. S. Pavanelli, A. V. Oliveira, H. Carrer, D. M. Carraro, L. M. Prioli. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetic Molecular Biology*. 25 (4):421-430.
- Raposo, M. I. B. 1995. Episódios intrusivos no Arco de Ponta Grossa, determinados através de um estudo paleomagnético. *Revista Brasileira de Geociências*, 25(1): 3–19.
- Reis R. E., S. O. Kullander & C. Ferraris. 2003. Check list of freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742 p.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the costal drainages of eastern Brazil: na example of fauna evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4(2): 225-246
- Riccomini, C. 1989. O rift continental do sudeste do Brasil. Unpublished PhD Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 256p.
- Riccomini, C. & M. Assumpção. 1999. Quaternary tectonics in Brazil. *Episodes*, 22(3): 221–225.
- Riccomini, C., L. G. Sant’Anna & A. L. Ferrari. 2004. Evolução geológica do rift continental do sudeste do Brasil. Pp. 383–405. *In*: Mantesso-Neto, V., A. Bartorelli, C. D. R. Carneiro & B. B. Brito-Neves (Eds.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo, Editora Beca, 673p.
- Rosenthal, A., O. Coutelle & M. Craxton. 1993. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*, 21(1): 173-174.
- Saadi, A. 1993. Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretações preliminares. *Geonomos* 1(1):1–15.
- Saadi, A., M. N. Machette, K. M. Haller, R. L. Dart, L. Bradley & A. M. P. D. Souza. 2002. Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. U.S. Geological Survey, Open-File Report 02-230. (available at <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230>).
- Scheel, J. J. 1973. Fish chromosome and their evolution. *Int Rep Denmarks Akvarium*, Charlottenlund, Denmark.
- Severi, W. & A. A. M. Cordeiro. 1994. Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçú. Curitiba, IAP/GTZ, 128p.
- StatSoft Inc. 2001. Statistica 6: data analysis software system. Tulsa. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>.
- Steavaux, J. C. 1994. The upper Paraná river (Brazil): geomorphology, sedimentology and paleoclimatology. *Quaternary International*, 21: 143-161.

Strecker, U., V. H. Faúndez & H. Wilkens. 2004. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 469-481.

Sworfford, D. L. 2000. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4,02b. Sinauer Association, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*_(24): 1596-1599.

Van Der Hammen, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography*, 1: 3-26.

Vicari, M. R., R. B. Noleto, R. F. Antoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 173-179.

Weitzman, S. H. & M. Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the refuges theory. Pp. 403-422. In: Prance, G. T. (ed.), *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York.

Weitzman, S. H., N. A. Menezes & M. J. Weitzman. 1988. Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Pp. 379-427. In: Vanzolini, P. E. & W. R. Heyer (Eds.). *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências, 488p.

Weitzman, S. H., L. R. Malabarba. 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes) In: Malabarba, L. R. , R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, C. A. Lucena (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Porto Alegre-RS : EDIPUCRS. 603 p.

Weitzman, S. H. & N. A. Menezes. 1998. Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, *Chrysobrycon*. Pp. 171-192. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.