

ROSANA DE MESQUITA ALVES

***Astyanax paranae* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DA BACIA DO ALTO
RIO PARANAÍBA: ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES E CONSERVAÇÃO
DA ESPÉCIE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Florestal

T

597
2019

Alves, Rosana de Mesquita, 1992-

Astyanax paranae (Characiformes, Characidae) da Bacia
do Alto Rio Paranaíba: estudos multidisciplinares e conservação
da espécie / Rosana de Mesquita Alves. – Rio Paranaíba, MG,
2019.

xii, 33f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Karine Frehner Kavalco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Peixes. 2. Genes mitoconriais. 3. Morfometria
geométrica. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de
Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Manejo e
Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários. II. Título.

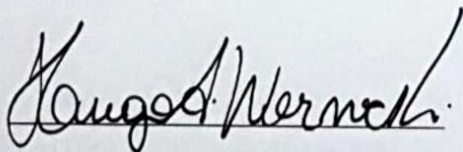
A474a

ROSANA DE MESQUITA ALVES

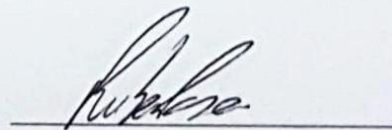
***Astyanax paranae* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DA BACIA DO ALTO
RIO PARANAÍBA: ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES E CONSERVAÇÃO
DA ESPÉCIE.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

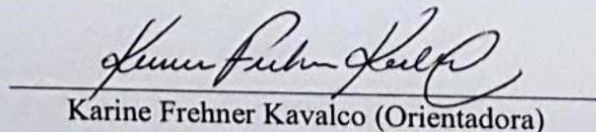
APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.



Hugo de Azevedo Werneck



Rubens Pasa



Karine Frehner Kavalco (Orientadora)

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida por cobrirem meu caminho de luz e bênçãos, mantendo minha fé sempre de pé e não me deixando desistir nos momentos de cansaço.

À minha mãe Márcia e minha Dora pelos esforços diários para me ajudar sempre nos estudos. Ao meu irmão Ricardo e demais familiares pelo amor e torcida por cada uma das minhas vitórias.

À minha orientadora e co-orientador, Dra. Karine Frehner Kavalco e Dr. Rubens Pazza pela oportunidade de trabalhar no LaGEEvo (Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva) desde a graduação, pelos ensinamentos diários e apresentação à essa área tão linda que é a pesquisa. Além do profissionalismo, agradeço pela empatia durante todos esses anos de convivência de trabalho e descontração no laboratório.

Aos colegas do LaGEEvo pela ajuda desde a coleta dos indivíduos até a preparação das amostras, e também pela amizade construída ao longo desse tempo juntos. Agradeço em especial ao Igor e Marcos, pela ajuda nas metodologias e discussões que contribuíram significativamente para o meu trabalho.

À Snaydia e Renan por estarem comigo desde o início, me ajudando em todas as etapas, desde a graduação até o mestrado. Com vocês a caminhada foi, com certeza, mais fácil e feliz. Obrigada pela amizade sincera.

Em uma parte mais especial, agradeço à Dinaíza, que além de amiga foi uma quase co-orientadora do meu trabalho, me ajudando em todos os momentos que precisei, não me deixando faltar calma e persistência para ver que no final tudo dá certo. Muito obrigada Dina!

À Elisa, minha querida Pará, agradeço pela ajuda na tradução do resumo e por estar sempre presente, mesmo distante. À Luana, Natália, Pollyana, Gustavo e Saulo, pela amizade e palavras de conforto nos momentos de desespero. Muito obrigada meus queridos!

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura de ensino e disponibilidade de funcionários incríveis que ajudaram em minha formação, e à Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação pelo recurso para sequenciamento das amostras de DNA.

Ao Programa de Pós Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários e aos seus professores pelos ensinamentos e transmissão de conhecimento. Aos secretários Edivânia e João Marcos pela solicitude em responder minhas dúvidas.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos. À CAPES pela concessão da bolsa durante esses dois anos de estudo.

O meu muito obrigada à todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1) <i>Astyanax paranae</i> : hábito de vida e distribuição.....	1
1.2) A Bacia do Paraná e do rio Paranaíba.....	2
1.3) <i>Astyanax paranae</i> : diversidade genética e filogenia.....	3
1.4) Marcadores moleculares: genes mitocondriais – Citocromo Oxidase <i>b</i>	5
1.5) Morfometria geométrica.....	6
2-OBJETIVOS.....	7
2.1) Objetivo geral.....	7
2.2) Objetivos específicos.....	7
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1) Área de estudo.....	7
3.2) Coleta e eutanásia dos indivíduos.....	10
3.3) Coleta de tecido e obtenção de DNA dos indivíduos.....	10
3.4) Reação em Cadeia da Polimerase - PCR e análises moleculares.....	10
3.5) Morfometria Geométrica.....	12
4-RESULTADOS.....	13
4.1) Análises moleculares referente ao gene <i>cyt b</i>	13
4.2) Análises morfológicas.....	17

5-DISSCUSSÃO.....	19
6-CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplar da espécie *Astyanax paranae*..... 2
- Figura 2:** Mapa da região hidrográfica da bacia do Paraná..... 3
- Figura 3:** Mapa indicativo da localização dos pontos de coleta. Em 1, bacias dos rio Paraná e São Francisco na América do Sul. Em 2, ampliação da região do Arco do Paranaíba, evidenciando a rede hidrográfica e pontos amostrados..... 8
- Figura 4:** Marcos anatômicos (*landmarks*) definidos para as análises morfométricas comparativas nas populações de *Astyanax paranae*..... 12
- Figura 5:** Árvore resultante de análise Bayesiana indicando a topologia final resultante das análises genéticas com o gene *cyt b* dos indivíduos de *Astyanax paranae* da região do Alto Paranaíba..... 13
- Figura 6:** Rede de haplótipos formada pela análise das sequências do gene *cyt b* dos indivíduos de *Astyanax paranae* da região do Alto Paranaíba..... 16
- Figura 7:** Formato do *shape* consenso para a espécie *Astyanax paranae* diante das populações analisadas..... 17
- Figura 8:** Análise das componentes principais (PC's) dos indivíduos das populações analisadas de *Astyanax paranae*. No canto superior esquerdo: variação do *shape* para a PC2; Canto inferior direito: variações para a PC1..... 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos de coleta, respectivas cidades, coordenadas geográficas e número de indivíduos utilizados em cada análise.....	9
Tabela 2: Valores de distância genética entre as populações de <i>Astyanax paranae</i> ...	14
Tabela 3: Valores de distância genética entre os indivíduos das populações de <i>Astyanax paranae</i>	
Tabela 4: Descrição dos haplótipos resultantes da análise de rede das sequências do gene <i>cyt b</i> . SJ2: Rio São João; RP1: Rio Paranaíba; PE: Parque de Exposições; AG5: Água Grande P5; ZAR: Zarico/Lava-Pés; BU: Buraco; F2: Ribeirão de Fora; Q2: Quilombo; OD2: Olhos d'água.....	15

RESUMO

ALVES, Rosana de Mesquita, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. *Astyanax paranae* (Characiformes, Characidae) da Bacia do Alto Rio Paranaíba: estudos multidisciplinares e conservação da espécie. Orientadora: Karine Frehner Kavalco.

Devido à enorme diversificação, tanto morfológica quanto comportamental dos peixes, estes se tornam um grupo de difícil identificação. Em algumas espécies do gênero *Astyanax*, que são peixes de pequeno porte, pertencentes à família Characidae, isso é bastante frequente. *Astyanax paranae*, espécie endêmica da Bacia do Paraná, tem como nicho preferencial regiões de cabeceiras de rios e riachos, o que contribui diretamente para um maior grau de endemismo e, possivelmente, para eventos importantes em processos evolutivos, como especiação alopátrica. Diante disso, espera-se que diferentes populações de alguns afluentes da Bacia do Paraná apresentem uma estruturação genética bem definida, assim como uma boa estruturação morfológica. Marcadores moleculares e morfometria geométrica são algumas das técnicas que permitem avaliar se o hábito sedentário em cabeceiras de tributários pode impedir fluxo gênico e facilitar que populações se diferenciem. Assim, o presente trabalho visa a utilização de tais ferramentas em estudos filogeográficos para reconstruir as relações evolutivas de nove populações de *A. paranae* na região do Alto Paranaíba. Para as análises filogenéticas houve extração de DNA de uma porção do fígado e/ou coração dos indivíduos, com posterior amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase *b* via PCR. Já na morfometria, os indivíduos depois de coletados foram fotografados e houve marcação dos pontos anatômicos (*landmarks*) para comparação das variações do shape entre as populações e posterior Análise dos Componentes Principais (PCA). Os resultados das análises filogenéticas por inferência Bayesiana demonstram a estruturação evidente de algumas populações, com uma leve sobreposição entre outras. Tais dados estão diretamente relacionados à proximidade e conectividade dos pontos de coleta. A rede de haplótipos confirma a maioria dos dados obtidos na Bayesiana, com diversidade haplotípica maior no centro da rede, e menor nas periferias, além disso, demonstra a população dispersora dos haplótipos, assim como a que manteve o haplótipo ancestral. Na morfometria os resultados diferem, já que não houve diferenciação morfológica expressiva entre as populações analisadas. Houve uma população que se diferenciou das

demais em ambas as análises, demonstrando a importância de um ambiente conservado para a manutenção dos indivíduos no meio ambiente, assim como sua diferenciação genética. Os resultados encontrados demonstram a eficácia de análises moleculares e morfológicas em definir as relações evolutivas entre populações, dando crédito à sua utilização em estudos filogeográficos. Além disso, possibilitam ampliar um pouco o conhecimento da história evolutiva de *A. paranae* na bacia, assim como sua diferenciação e estruturação genética, o que pode ser aplicado em estratégias de manejo e conservação da mesma.

ABSTRACT

ALVES, Rosana de Mesquita, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. ***Astyanax paranae* (Characiformes, Characidae) from the Upper Paranaíba River Basin: multidisciplinary studies and species conservation.** Adviser: Karine Frehner Kavalco.

Due to the enormous diversification, both morphological and behavioural of the fishes, these become a group of difficult identification. In some species of the genus *Astyanax*, which are small size fish belonging to the Characidae family, this is quite frequent. *Astyanax paranae*, an endemic species of the Paraná Basin, has as preferred niche regions of headwaters of rivers and streams, which contributes directly to a greater degree of endemism and, possibly, to important events in evolutionary processes, such as allopatric speciation. Therefore, it's expected that different populations of some affluent of the Paraná Basin will present a well-defined genetic structure, as well as a good morphological structuring. Molecular markers and geometric morphometry are some of the techniques that allow us to evaluate whether the sedentary habit in tributaries headers can prevent gene flow and facilitate populations to differentiate. Thereby, the present work aims at the use of such tools in phylogeographic studies to reconstruct the evolutionary relationships of nine populations of the *A. paranae* in the Alto Paranaíba region. For the phylogenetic analyses, DNA was extracted from a portion of the liver and/or heart of the individuals, with further amplification of the mitochondrial Cytochrome Oxidase *b* gene via PCR. In the morphometry, the individuals after being collected were photographed and there were marking of the anatomical points (landmarks) for comparison of the shape variations between the populations and subsequent Principal Component Analysis (PCA). The results of the phylogenetic analyzes by Bayesian inference demonstrate the evident structuring of some populations, with a slight overlap among others. These data are directly related to the proximity and connectivity of the collection points. The haplotype network confirms most of the data obtained in the Bayesian, with higher haplotypic diversity in the centre of the network, and lower in the peripheries, in addition, it demonstrates the dispersal population of the haplotypes, as well as that which maintained the ancestral haplotype. In the morphometry the results differ, since there was no morphological differentiation between the analyzed populations. There was a population, the of Parque de Exposições, that differed from the others in both analyzes, demonstrating the

importance of a conserved environment for the maintenance of individuals in the environment, as well as their genetic differentiation. The results show the efficacy of molecular and morphological analyzes in defining evolutionary relationships among populations, giving credit to their use in phylogeographic studies. In addition, allowing a little knowledge of the evolutionary history of the *A. paranae* in the basin, as well as its differentiation and genetic structuring, which can be applied in management strategies and conservation of the same.

1) Introdução

1.1) *Astyanax paranae*: hábito de vida e distribuição

Peixes apresentam uma considerável flexibilidade de adaptação à diversas condições do meio ambiente, o que intensifica sua diversificação, tanto morfológica e fisiológica, quanto comportamental (Purdom, 1993). De grande importância para a biodiversidade aquática mundial, a região Neotropical possui grande riqueza faunística de peixes de água doce, possuindo, assim, grande representatividade da ictiofauna dulcícola conhecida (Eschmeyer, 2015).

Dentre as ordens de peixes presentes nessa região, inclui-se a dos Characiformes, a qual compreende 24 famílias (Eschmeyer, 2018). A maior delas é a Characidae, com cerca de 1161 espécies (Eschmeyer, 2018) e uma ampla riqueza em taxonomia, morfologia e comportamento (Javonillo *et al.*, 2010). Pertencente à essa família, o gênero *Astyanax* (Baird & Girard, 1854) se encontra amplamente distribuído nos cursos d'água incluídos na região Neotropical (Lima *et al.*, 2003). Espécies desse grupo possuem grande capacidade de explorar variados micro habitats, levando à formação de pequenas populações restritas, causando, assim, variações entre populações (Garutti & Britski, 2000).

As características morfológicas comuns do grupo são: presença da nadadeira adiposa, linha lateral completa, duas fileiras de dentes pré-maxilares, com cinco dentes na parte interna pré-maxilar, altura do corpo com cerca de três vezes o comprimento padrão e escamas com tamanho padronizado, as quais cobrem apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1984; Eigenmann, 1917).

A diversidade do gênero pode ser representada com exemplos como o complexo *Astyanax scabripinnis*, o qual foi proposto com base em caracteres citogenéticos e morfológicos (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Peixes pertencentes a esse complexo geralmente habitam regiões de cabeceiras de rios e riachos (Britski, 1972). Esse modo de vida das espécies do complexo, favorece a formação de pequenas populações que se isolam (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), o que pode resultar em especiação alopátrica das mesmas.

As espécies representantes do complexo *A. scabripinnis* estão amplamente distribuídas por grandes bacias hidrográficas, como a do Rio Paraná e São Francisco

(Bertaco & Lucena, 2006), causando assim forte influência sobre as relações evolutivas e diversidade do grupo (Kavalco, *et. al.*, 2016).

A espécie antes definida como *Astyanax scabiprinnis paranae*, passou a ser definida como *Astyanax paranae* (Eigenmann, 1914), (Figura 1), sendo a única do complexo presente na Bacia do Rio Paraná (Marreta, 2011). Trata-se de uma espécie de peixe de pequeno porte, dulcícola, conhecida popularmente como Lambari, e habitante de cabeceiras de rios e riachos, o que contribui diretamente para o isolamento das populações (Eigenmann, 1914). Quanto aos hábitos alimentares, possui dieta variada alimentando-se de insetos, folhas, algas, sementes e pequenos frutos (Godoy, 1975; Ferreira, 2004). Em relação à reprodução, é uma espécie que possui dimorfismo sexual, sendo os machos menos robustos que as fêmeas (Eigenmann, 1914; Godoy, 1975), com período reprodutivo de agosto a fevereiro, simultâneo à migrações curtas e sem cuidado parental (Suzuki *et. al.*, 2004).



Figura 1: Exemplar da espécie *Astyanax paranae*.

1.2) A Bacia do Paraná e do rio Paranaíba.

Pertencente à região ictiofaunística do Paraná (Figura 2), a Bacia do Paraná inclui um complexo de grandes rios como Uruguai, Paraguai, Paraná e da Prata, sendo de extrema importância hidrológica para a América do Sul, já que possui cerca de 3,2 milhões de km² em extensão de drenagem (Lowe Mcconnell, 1999). Como porção hidrográfica dessa bacia, o Alto Rio Paraná possui 900.000 km² de extensão, drenando estados como Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, e abriga grandes rios como Paranaíba e Paranapanema (Castro *et al.*, 2005). Em termos de diversidade da ictiofauna, a Bacia do Paraná abriga cerca de 310 espécies distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (Langeani *et. al.*, 2007). As ordens mais representativas

dessa diversidade, são Siluriformes e Characiformes, representando um total cerca de 80% das espécies pertencentes à Bacia (Langeani *et. al.*, 2007).

A Bacia do rio Paraná está separada da Bacia do São Francisco pelo Arco do Paranaíba. Com base em estudos da ictiofauna da região, é verificado um elevado grau de endemismo das populações, devido ao isolamento causado pelo soerguimento do arco (Campos *et al.*, 1997). Além de grandes rios, a bacia conta com uma grande rede de riachos e cabeceiras, habitats preferidos de peixes de pequeno porte. Tal fator também influencia diretamente no grau de endemismo das populações, já que ambientes de cabeceiras restringem a distribuição geográfica das mesmas (Castro *et al.*, 2005).

A Bacia do Rio Paranaíba, localizada na região do Cerrado Mineiro desde o Alto Paranaíba até o Triângulo Mineiro, possui cerca de 61.901 km² de extensão, sendo também de grande relevância na distribuição de *Astyanax paranae* (Flauzino *et. al.*, 2010). A Bacia é considerada a segunda maior da rede hidrográfica do Alto Paraná, com sua nascente localizada na Mata da Corda, no município de Rio Paranaíba/MG (ANA, 2008).



Figura 2: Mapa da região hidrográfica da Bacia do Paraná.

1.3) *Astyanax paranae*: diversidade genética e filogeografia.

Estudos citogenéticos já realizados supõem que *Astyanax paranae* pode ser considerado como um complexo de espécies pertencente a Bacia do Paraná, já que foram encontrados variados números diplóides, como: $2n=50$, $2n=48$ e, em algumas

populações, $2n=46$ cromossomos (Moreira-Filho *et al.*, 1991; Porto-Foresti *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 1998; Alves & Martins-Santos, 2002). Diante disso, vê-se a necessidade de estudos filogeográficos que permitam o entendimento da estruturação genética das populações.

A filogeografia estuda os processos históricos que resultaram na maneira como se dá a distribuição geográfica das linhagens, bem como uma base da variabilidade genética existente, podendo essa ser em relação à uma espécie ou entre espécies correlacionadas (Avise, 2000; Martins & Domingues, 2011). Estudos filogeográficos podem ser baseados em análises morfológicas, comportamentais e principalmente moleculares, desde que sejam voltados para perspectivas filogenéticas relacionadas à distribuição geográfica das populações (Avise, 2000). A metodologia molecular da rede de haplótipos serve como base para análise da ligação por haplótipos mais semelhantes geneticamente, demonstrando também os passos mutacionais que os interconectam (Avise, *et al.*, 1987).

O fundamento teórico para a filogeografia se dá através da “Teoria do Coalescente”. A base dessa teoria é de que em uma população novos alelos surgem devido à mutações que ocorrem ao longo do tempo, e estes são derivados de um ancestral comum. Ou seja, os alelos coalescem para um determinado ponto na história evolutiva passada da população (Donnelly & Tavaré, 1986; Hudson, 1990; Posada & Crandall, 2001). Ainda segundo essa teoria, haplótipos de maiores frequências são aqueles mais antigos no tempo evolutivo, estando presentes na população há mais tempo. Estes tendem a se concentrar no interior da rede e possuem maior número de interconexões com outros haplótipos. Consequentemente, haplótipos de menor frequência são aqueles que surgiram por mutações mais recentes, e se localizam nas periferias da rede (Posada & Crandall, 2001).

A identificação de espécies possui relevante importância para a compreensão de processos evolutivos que levaram à estruturação genética das populações, além do esclarecimento de padrões biológicos das mesmas (Fernandes, *et al.*, 2009). Tal fato também está relacionado com a diversidade encontrada dentro ou entre populações, podendo servir para aplicação em estratégias de manejo e conservação das espécies. Organismos respondem às pressões sofridas pelo ambiente, seja com alterações morfológicas ou genéticas (diversidade, diferenciação entre populações, acúmulo de mutações), sendo assim importantes objetos de estudo na área de pesquisas evolutivas.

Estudos filogeográficos e filogenéticos tendem a suprir esses objetivos, já que revelam as possíveis relações filogenéticas entre táxons e os acontecimentos históricos responsáveis pela forma de distribuição geográfica das linhagens evolutivas.

1.4) Marcadores moleculares: genes mitocondriais – Citocromo Oxidase *b*.

Há algumas décadas que o DNA mitocondrial é usado em estudos que envolvem estrutura populacional, relações filogenéticas e aspectos evolutivos de indivíduos e/ou populações (Wilson *et al.*, 1985; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Avise, 1994). Seu uso constante deve-se às suas características genéticas e estruturais únicas, como: ser de herança materna, um genoma pequeno, ausência de recombinação, conteúdo gênico conservado, alta taxa evolutiva, entre outras (Avise, *et al.*, 1987). Recentemente, o genoma mitocondrial completo de *Astyanax paranae* foi descrito no trabalho de Silva *et al.* (2016). Este possui 16.707 pares de base, 13 PCGs, 22 tRNAs de transferência, 2 RNAs ribossômicos, uma região controle (D-loop) e origem da replicação do lightstrand (OL).

Várias metodologias envolvendo esse tipo de genoma, para estudos de variabilidade e estruturação genética entre populações, podem ser utilizadas. Uma delas é amplificação via Reação em cadeia da Polimerase (PCR) de partes da molécula e posterior análise das sequências obtidas. Um dos genes utilizados comumente é o gene da Citocromo *b* Oxidase (Arias & Sheppard., 1996).

O gene *cyt b*, devido a sua variabilidade de sequências, se faz útil em estudos de comparação de espécies de mesmo gênero e/ou família, sendo constantemente aplicado em pesquisas de análises filogenéticas e evolutivas (Lara *et al.*, 1996; Farias, *et al.*, 2001; Perdices, *et al.*, 2004). Outra vantagem em relação ao seu uso é que a região de tal gene pode ser amplificada em inúmeras espécies de animais, e utilizada apenas de um par de iniciadores universais na PCR (Kocher, 1989; Bartlett, 1992; Branicki, *et al.*, 2003). Além disso, o gene possui informação específica para cada espécie, sendo assim muito útil em trabalhos que envolvem análises filogenéticas (Parson, *et al.*, 2000).

Trabalhos recentes como os de Zhu *et. al.* (2016) e Kumar *et. al.* (2017), demonstram a eficiência do gene em pesquisas de estrutura e diferenciação genética de populações de espécies de peixes.

Devido ao reduzido ou, até mesmo inexistente fluxo gênico entre as populações, espera-se que diferenças genéticas se acumulem ao longo do tempo (De Souza, 2015). Sendo assim, análises envolvendo genes mitocondriais são de grande valia na concessão e interpretação dos dados. Além disso, são bastante úteis em análises filogeográficas, já que suas sequências possuem informações genealógicas relevantes para a construção da história evolutiva das linhagens genéticas de populações de uma ou mais espécies (Avise, 1991; Avise 2000).

1.5) Morfometria geométrica

A morfometria geométrica relaciona a forma do corpo baseada em pontos anatômicos marcados e comparados entre indivíduos de uma mesma população ou entre diferentes populações, fornecendo dados úteis na diferenciação das populações e variações existentes no shape dos espécimes (Rohlf & Marcus, 1993).

Na área da morfometria geométrica, o *shape* é definido como a informação geométrica resultante quando os elementos de tamanho, posição e orientação são extraídos de um objeto (Kendall, 1977; Dryden & Mardia, 1998). A diversidade de tipos de processos biológicos e influências ambientais promove uma diferenciação no shape. Sendo assim, a delimitação deste contribui para análises em estudos biológicos, já que fornece informações relacionadas às causas das variações e transformações morfológicas nos indivíduos (Zelditch *et al.*, 2012).

Análises morfológicas, com base em caracteres morfométricos, fornecem dados de grande valia para interpretação de relações evolutivas entre populações de diferentes localidades (Costa & Sá, 1979; Wainwright & Reilly 1994). A importância de tais análises deve-se, principalmente, ao fato de que algumas das respostas mais rápidas apresentadas por populações em resposta às pressões ambientais, são aquelas relacionadas a modificações na morfologia de seus indivíduos (Streelman & Danley, 2003).

Devido às características de *Astyanax paranae*, como habitat preferencial em ambientes de cabeceiras de rios e riachos, a ideia de haver diferenças morfológicas entre as populações é uma hipótese válida. Além disso, o fluxo gênico entre diferentes populações é dificultado pelas barreiras geográficas (Desordi *et. al.*, 2012; De Souza, 2015). Diante disso, análises morfométricas relacionadas à distribuição da espécie também servem como modelo de estudo das relações entre populações e ambiente e, assim, sobre sua evolução ao longo do tempo (Peres-Neto, 1999).

2) Objetivo geral

Demonstrar as relações filogenéticas e morfológicas de *Astyanax paranae* na bacia do alto rio Paranaíba e, assim, contribuir com informações relevantes que auxiliem na elaboração de propostas de conservação e manejo dessa espécie.

2.1) Objetivos específicos

1 - Caracterizar, genética e morfológicamente populações de *Astyanax paranae* da bacia hidrográfica do Alto Paranaíba, avaliando sua estruturação genética e morfológica, o fluxo gênico e a diferenciação entre populações.

2 – Construir uma proposta de filogeografia de populações da região estudada;

3 – Produzir informações que possam auxiliar na elaboração de propostas de conservação e manejo da espécie na bacia hidrográfica do rio Paranaíba.

3) Materiais e métodos

3.1) Área de estudo

Indivíduos de diversas populações de *Astyanax paranae* foram coletados, mediante licença ambiental do SISBIO, em rios e riachos pertencentes à Bacia do Rio Paranaíba (Figuras 3, 4 e 5), a qual está inclusa na Bacia do Paraná. Serão eles: Riacho Água Grande, Córrego do Zarico/Lava Pés, Rio São João e Paranaíba, Córrego do Parque de Exposições e Buraco, Ribeirão de Fora, Ribeirão do Quilombo e Córrego Olhos d'água. Após coleta dos mesmos e extração de tecido, os espécimes foram

depositados na Coleção Zoológica do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da Universidade Federal de Viçosa, *Campus Rio Paranaíba*.

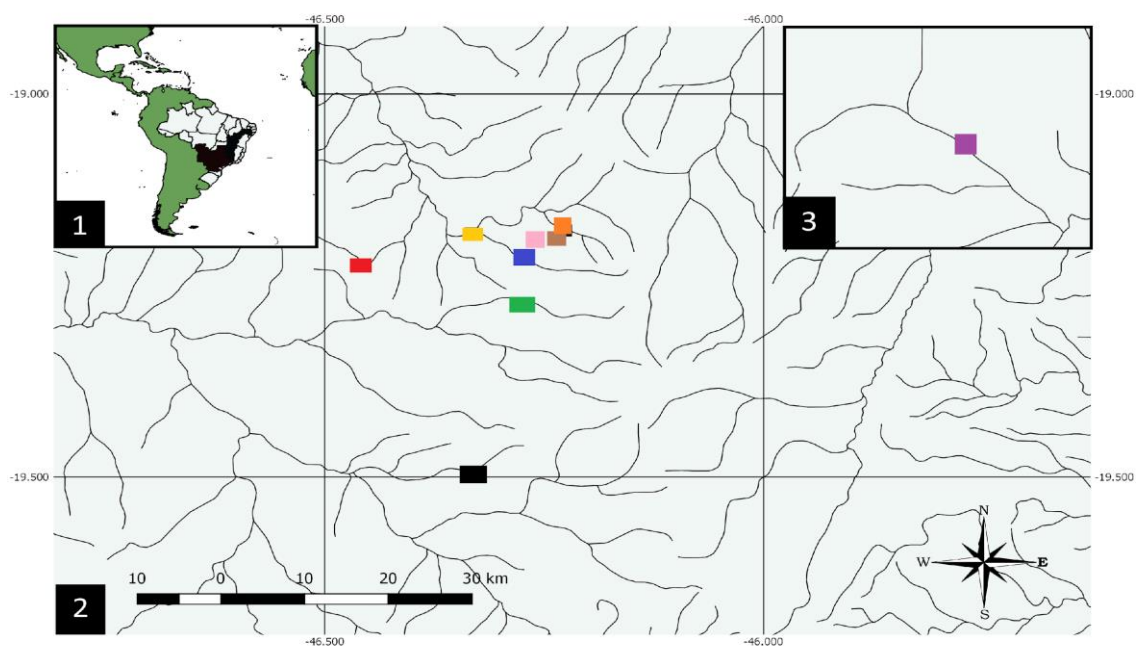


Figura 3: Mapa indicativo da localização dos pontos de coleta. 1 - Representação das bacias dos rio Paraná e São Francisco na América do Sul. 2 - Ampliação da região do Arco do Paranaíba, evidenciando a rede hidrográfica e pontos amostrados (quadrados): Vermelho: Ribeirão de Fora; Amarelo: Rio Paranaíba; Verde: Rio São João; Azul: Riacho Olhos d'água; Rosa: Córrego do Parque do Zarico; Preto: Ribeirão do Quilombo; Marrom: Córrego do Parque de Exposições; Laranja: Riacho Água Grande. Em Roxo, na parte 3 destacada, Córrego do Buraco, que se localiza no estado de Goiás.

Tabela 1: Pontos de coleta, cidade, coordenadas geográficas e número de indivíduos utilizados em cada análise.

Ponto de Coleta	Coordenadas	Cidade	Morfometria	<i>Cyt b</i>
Riacho Água Grande P5	19.177967°S 46.22613°W	Rio Paranaíba/MG	9	3
Córrego do Zarico	19.191615°S 46.257387°W	Rio Paranaíba/MG	10	3
Rio São João P2	19.308256°S 46.397117°W	Rio Paranaíba/MG	8	6
Rio Paranaíba P1	19.182286°S 46.332794°W	Rio Paranaíba/MG	10	10
Córrego do Parque de Exposições	19.187714°S 46.236178°W	Rio Paranaíba/MG	7	6
Córrego do Buraco	17.56637°S 47.69833°W	Campo Alegre de Goiás/GO	6	2
Ribeirão de Fora P2	19.2232°S 46.45889°W	Rio Paranaíba/MG	10	3
Ribeirão do Quilombo P2	19.49413°S 46.33163°W	Ibiá/MG	10	3
Córrego Olhos d'água P2	19.21285°S 46.27091°W	Rio Paranaíba/MG	11	3

3.2) Coleta e eutanásia dos indivíduos

Os indivíduos foram coletados usando redes de arrasto, tarrafa, peneiras e varas de pesca. O transporte para o Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva foi feito em baldes com água, sendo este fornecido por bombinhas de ar comprimido. Depois de acondicionados em aquários com aeradores e alimentação diária regular, os indivíduos passaram por período de aclimatação.

Os indivíduos coletados foram então eutanasiados de acordo com as normas da Resolução Normativa Nº 37 do CONCEA/MCTIC – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. A eutanásia é feita por imersão dos peixes em um recipiente contendo solução de concentração 1mL de óleo de cravo/1L de água, o que produz anestesia e inconsciência.

3.3) Coleta de tecido e obtenção de DNA dos indivíduos

Para extração de DNA das amostras, foram retirados tecidos do fígado, coração, musculatura e/ou nadadeiras dos indivíduos, sendo estes depositados no Banco de Tecidos do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva – LaGEEvo. Os exemplares amostrados foram então fixados em formaldeído 10% e posteriormente mantidos em etanol 70%, sendo tombados na seção ictiológica da Coleção de Vertebrados do Campus UFV Rio Paranaíba, onde receberam número de tombo correspondente ao tombo do banco de Tecidos..

Os procedimentos posteriores de extração de DNA foram realizados de acordo com a metodologia do Kit de purificação da marca Invitrogen, conforme instruções dadas pelo fabricante. Em seguida, foi feita a quantificação de cada uma das amostras através de eletroforese em gel de agarose 1% e Low Mass Ladder (Invitrogen), e posterior diluição solução de uso com concentração de dez nanogramas de DNA por microlitro.

3.4) Reação em Cadeia da Polimerase - PCR e análises moleculares

Para amplificação do gene da citocromo *b*, foi utilizado como referência Perdices (2002), com alterações. Os componentes/quantidades da reação para cada indivíduo foram: 2,5 µl de tampão, 1,0 µl de magnésio (MgCl₂), 1,0 µl de cada primer

correspondente, 1,5 µl de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), 0,2 µl da enzima *Taq*-Polimerase, 5,0 µl de DNA correspondente de cada indivíduo e 12,8 µl de água ultra pura, perfazendo volume total de 25 µl. Os primers utilizados na amplificação foram: H16460 - 5'CGAYCTTCGGATTACAAGAC3' e GluDG.L - 5' TGACCTGAARAACCAAYCGTT3' (Perdices, 2002).

As reações foram realizadas em termociclador com as seguintes condições: temperatura de 94°C para desnaturação inicial por 4 minutos; e 35 ciclos repetidos de 94°C para desnaturação por 15 segundos, 56,6°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por dois minutos para extensão (Prioli et. al., 2002). O sequenciamento foi feito por empresa terceirizada.

Para análise e visualização das sequências obtidas e posterior alinhamento utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (Thompson *et al.*, 1994) foi utilizado software MEGA v6.06 (Tamura *et al.*, 2011), aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (20) e extensão de gaps (6,66).

Para a construção do filograma de Máxima Verossimilhança, foi utilizando o software IQ-TREE 1.5.6 (Nguyen *et al.*, 2014; Chernomor *et al.*, 2016). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado através do Bayesian Information Criterion (BIC). O modelo de substituição utilizado, de acordo com análises feitas no programa, foi o HKY+G.

Para a inferência Bayesiana foi utilizado o software MrBayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Para definição do melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as partições do gene Citocromo *b*, foi utilizado o software PartitionFinder 1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012). Após o final da corrida, verificou-se as convergências das cadeias de Markov através do software Tracer v.1.6. Para corridas de boa qualidade, o tamanho efetivo da amostra (ESS) deve estar, geralmente, acima de 200. A visualização final da árvore foi feita através do software FigTree v.1.4.2. Em ambas as análises filogenéticas, foi adicionada uma sequência de *A. rivularis* como outgroup.

Para construção da rede de haplótipos referentes às sequências obtidas com o gene Citocromo *b* foram utilizados os programas MEGA v6.06 (Tamura *et al.*, 2011) e DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009), e o método Median Joining (Bandelt *et al.* 1999) implementado ao Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd).

Ainda no software MEGA V6.06 (Tamura *et al.*, 2011), foram calculadas as distâncias genéticas dentro e entre as populações analisadas.

3.5) Morfometria Geométrica

Após coleta e eutanásia dos indivíduos, estes foram fotografados com câmera Sony Cyber-Shot, resolução de 14,1-3 megapixels e zoom de 4x. O software TPSUtil 1.6 (Rohlf, 2013) é responsável por agrupar e formatar os dados obtidos em um arquivo adequado. Quatorze marcos anatômicos foram selecionados para representar a forma geral do corpo dos peixes (Figura 4), e sua digitalização é feita através do sistema de software TpsDig 2.26 (Rohlf, 2015). As matrizes do *shape* foram obtidas através da análise de procrustes com o auxílio do sistema de software Morpho J 1.18 (Klingenberg, 2011), com o objetivo de eliminar erros de escala, orientação e posição. Em seguida, no mesmo software foi realizada análise de componentes principais (PCA) dos resíduos de procruste. As diferenças observadas resultam apenas da variação de formas (Bookstein, 1991; Klingenberg, 2002). O teste de normalidade Shapiro-Wilk W para verificar a confiança dos dados foi feito através do software PAST v2.17 (Hammer *et al.*, 2001).

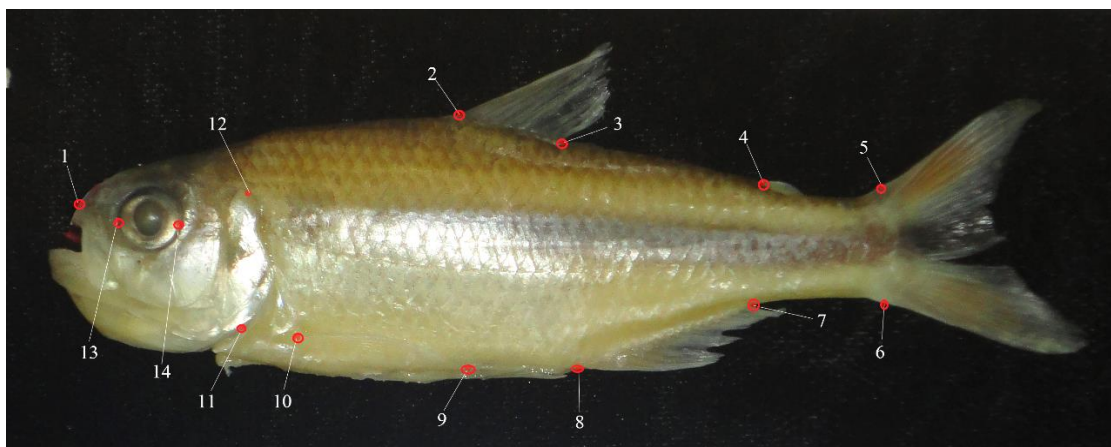


Figura 4 – Marcos anatômicos (Landmarks). 1- rostrum; 2- inserção anterior da nadadeira dorsal; 3- inserção posterior da nadadeira dorsal; 4- inserção posterior da nadadeira adiposa; 5- inserção superior do primeiro raio da nadadeira caudal; 6- inserção inferior do último raio da nadadeira caudal; 7- inserção posterior da nadadeira anal; 8- inserção anterior da nadadeira anal; 9- inserção da nadadeira ventral; 10- inserção da nadadeira peitoral; 11- limite inferior da abertura opercular; 12- limite superior da abertura opercular; 13- limite anterior da órbita ocular; 14- limite posterior da órbita ocular.

4) Resultados

4.1) Análises moleculares referente ao gene *cyt b*:

A análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança feita com as sequências do gene *cyt b* demonstrou a estruturação dos 38 indivíduos em dois clados principais, com exclusão do grupo externo utilizado para comparação, *Astyanax rivularis* (Figura 5). Os valores de sustentação dos ramos está indicado na figura correspondente.

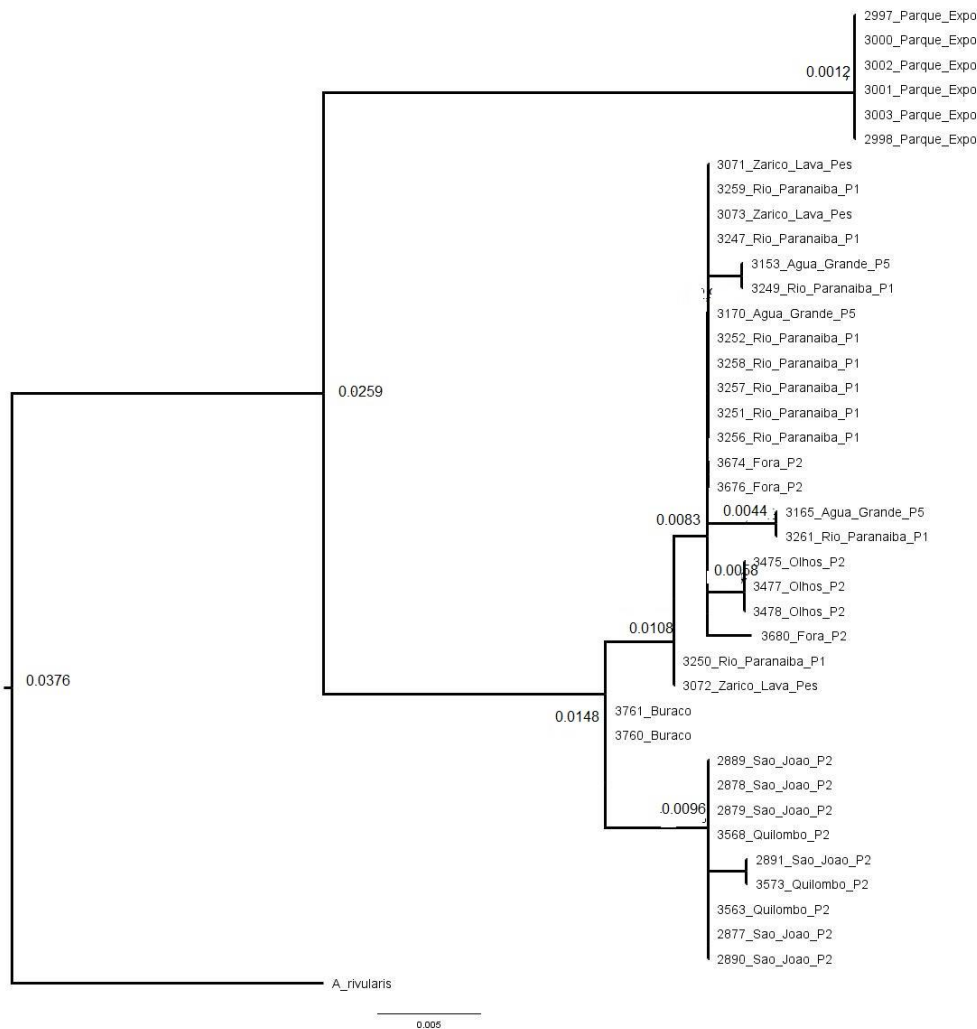


Figura 5: árvore resultante de análise Bayesiana a partir do gene *cyt b* dos indivíduos de *Astyanax paranae* da região do Alto Paranaíba. Os valores de sustentação dos ramos estão representados na figura.

Um dos agrupamentos principais é composto somente por indivíduos do Parque de Exposições, indicando uma clara diferença genética dessa população com as demais. O outro é composto pelas demais populações, com uma divisão em novos agrupamentos. Nestes, a estruturação mais evidente se deu nas populações dos Rio São João e

Paranaíba, dos Córregos do Buraco e Olhos d'água. As demais ficaram intercaladas com as populações citadas anteriormente, não havendo uma diferenciação expressiva destas (Figura 5).

Os cálculos de distância genética entre as populações, evidenciaram uma alta diferença genética da população do Parque de Exposições com as demais (cerca de 0,48). Com exclusão dessa, as outras possuem uma baixa distância genética entre si (Tabela 2). As distâncias genéticas intrapopulacionais demonstraram a homogeneidade genética dos indivíduos pertencentes às mesmas populações (Tabela 3).

Tabela 2: Valores de distância genética entre as populações de *A. paranae*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1-Olhos									
2-Quilombo	0.011								
3-São João	0.013	0.000							
4-Parque	0.048	0.044	0.048						
5-Zarico	0.002	0.010	0.011	0.046					
6-Água G	0.004	0.012	0.013	0.049	0.003				
7- Rio P	0.003	0.011	0.011	0.048	0.001	0.002			
8- Fora	0.002	0.011	0.012	0.049	0.002	0.003	0.001		
9-Buraco	0.007	0.005	0.005	0.040	0.005	0.008	0.006	0.007	

Tabela 3: Valores de distância genética intrapopulacional de *A. paranae*.

	d
1-Olhos	0.000
2-Quilombo	0.000
3-São João	0.001
4-Parque	0.000

5-Zarico	0.002
6-Água G	0.003
7-Rio P	0.001
8-Fora	0.001
9-Buraco	0.000

Pela análise da rede referente às sequências do gene *cyt b*, percebe-se que no interior da rede localizam-se os haplótipos de maior frequência, enquanto que nas periferias encontram-se os menos comuns (Figura 7). No total foram observados 29 haplótipos (Tabela 4 em anexo).

Os haplótipos de maior frequência são os de número 7, 20 e 26, representando, respectivamente, indivíduos do Rio São João, Córrego do Parque de Exposições e Rio Paranaíba (com um indivíduo do Riacho Água Grande). Os demais foram encontrados em apenas um indivíduo, com exceção do haplótipo 25, o qual teve frequência igual à dois (Figura 7). A diversidade haplotípica encontrada foi de 0.74.

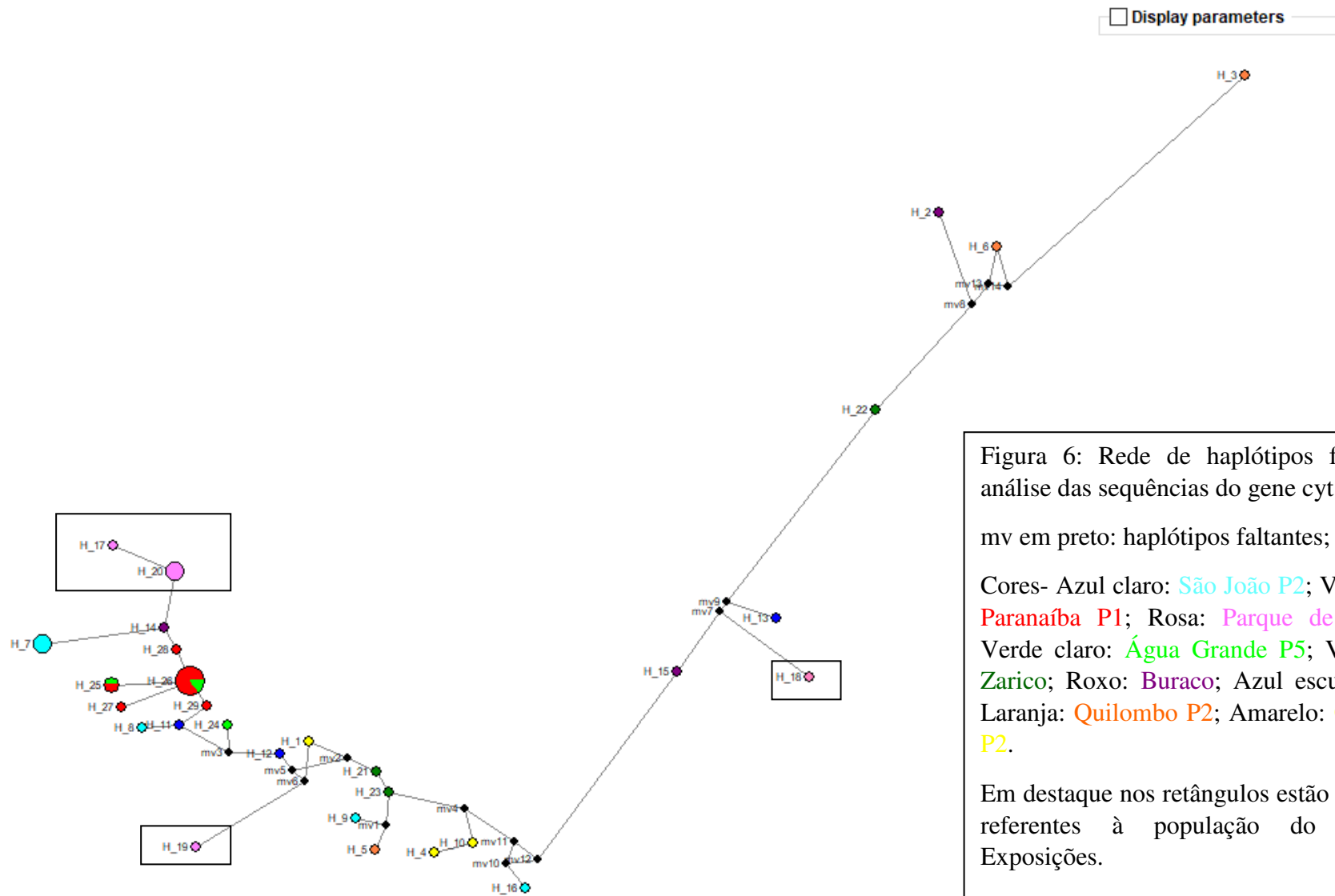


Figura 6: Rede de haplótipos formada pela análise das sequências do gene *cyt b*.

mv em preto: haplótipos faltantes;

Cores- Azul claro: São João P2; Vermelho: Rio Paranaíba P1; Rosa: Parque de Exposições; Verde claro: Água Grande P5; Verde escuro: Zarico; Roxo: Buraco; Azul escuro: Fora P2; Laranja: Quilombo P2; Amarelo: Olhos d'água P2.

Em destaque nos retângulos estão os haplótipos referentes à população do Parque de Exposições.

Os passos mutacionais não foram representados na figura por questões de melhor visualização dos dados.

4.2) Análises morfológicas

A análise dos componentes principais (PC) revelou que não há uma ordenação morfoespacial evidente entre as populações demonstradas. A população do Córrego do Parque de Exposições (exemplificada pela cor verde-água) foi a que se mostrou mais distante morfológicamente das demais, mostrando uma leve separação do conjunto (Figura 9). O *shape* consenso das populações analisadas está demonstrado na Figura 8. As PC's mais influentes na variação encontrada foram 1 e 2, com 21,8% e 16,6%, respectivamente. As oscilações do *shape* no teste de regressão nas PC's 1 e 2 estão representados também na figura. O teste de normalidade Shapiro-Wilk W provou a confiabilidade dos dados e sua distribuição normal.

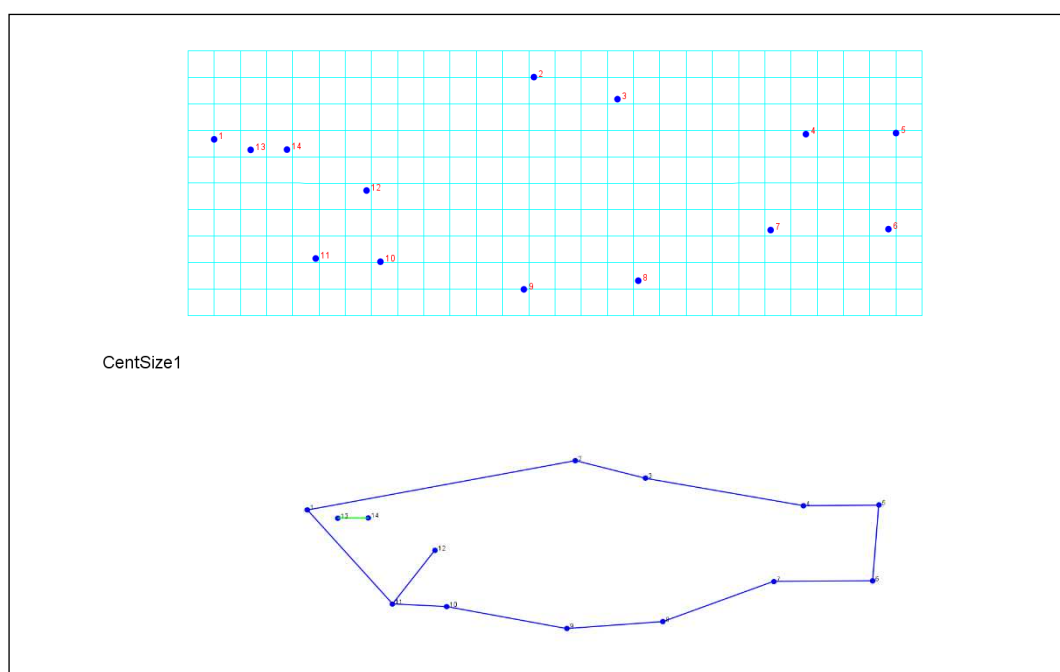


Figura 8: Formato do shape consenso para a espécie *Astyanax paranae* diante das populações analisadas.

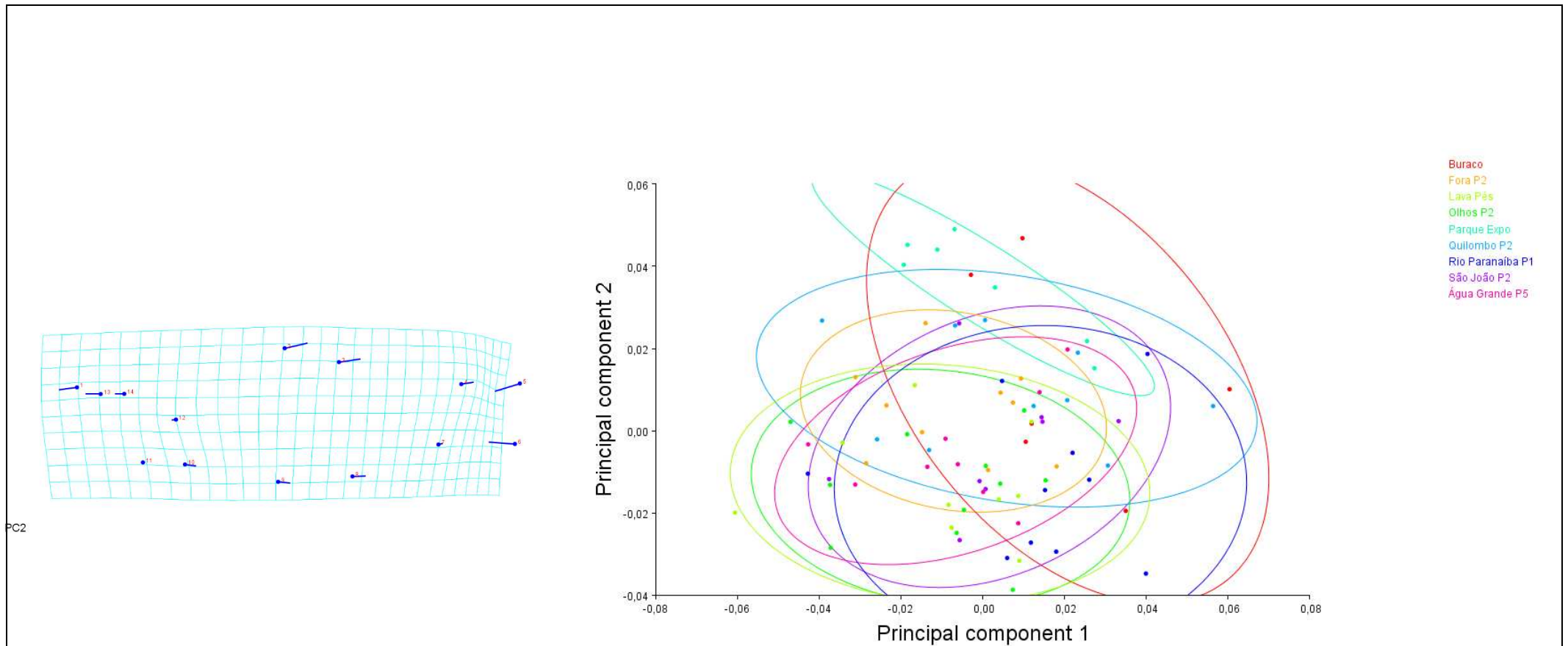
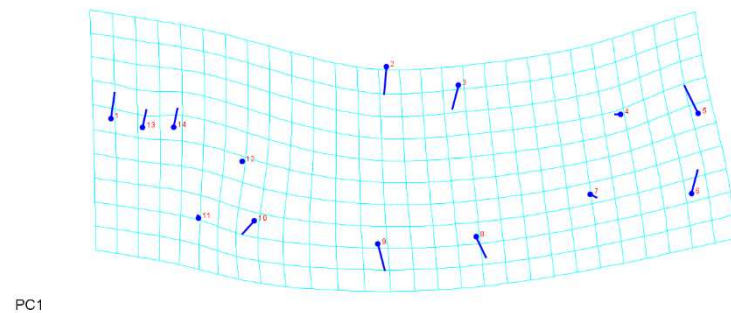


Figura 8: Análise das componentes principais (PC's) dos indivíduos das populações analisadas de *A. paranae*.

No canto superior esquerdo, temos a variação do *shape* para a PC2, enquanto que no canto inferior direito temos as variações da PC1.

No canto superior direito, temos a PCA geral das populações, com as cores descritas ao lado.

O teste de normalidade Shapiro-Wilk W provou a confiabilidade dos dados (95%) e distribuição normal.



5) Discussão

Os resultados encontrados demonstraram que existe uma distância genética, mesmo que tênue, entre a maioria das populações analisadas. Houve a distinção (mais sutil na morfologia e mais expressiva na genética) da população do Parque de Exposições em relação às demais, levantando evidências de que esta população poderia ser representativa de uma nova espécie de *Astyanax*, uma vez que possui distância genética acima de 4,5% para o gene analisado. April e colaboradores (2013), estabeleceram a diferenciação mínima de 2% na sequência das bases do DNA mitocondrial de peixes para definir a distinção entre espécies. Esses dados reafirmam ainda mais o alto grau de isolamento da população de estudo, o que é diretamente correlacionado com sua diferenciação genética.

Diferenças genéticas se acumulam devido às mutações que ocorrem ao acaso nos indivíduos. Como o fluxo gênico é raro nesses casos de isolamento por barreiras geográficas (Castro, 1999; De Souza et al., 2015), tende a levar à uma diminuição da diversidade genética e aumento da diferenciação entre populações da mesma espécie (Frankham, et al., 2002). Este isolamento entre populações causado por barreiras geográficas faz com que cada população, restrita ao seu “espaço”, desenvolva ao longo do tempo, e em seu próprio sistema, características próprias e distintivas (Lowe-McConnell, 1969). Tais barreiras também impedem/diminuem o fluxo gênico entre populações, reforçando ainda mais o isolamento e estruturação das mesmas. Isso foi demonstrado nos resultados das análises filogenéticas com o gene *cyt b*, mas as diferenças morfológicas não foram significativas.

Um fenômeno responsável pela especiação alopátrica, e presente na maioria das populações de *Astyanax paranae*, é definido como vicariância (Castro, 1999), a qual ocorre quando um dado ancestral distribuído em áreas geográficas maiores tem sua população dividida em algum momento pelo surgimento de uma barreira geográfica, formando subpopulações e, assim, reforçando a ideia de endemismo para peixes habitantes de cabeceiras de rios (Castro, 1999; Desordi et al., 2012; De Souza et al., 2015). Esse grupo de *Astyanax* possui uma distribuição com alto grau de endemismo, principalmente devido ao hábito preferencial de vida, habitando regiões restritas de cabeceiras de rios e riachos (Garutti, 1995). Esse fato está associado com a capacidade do grupo em explorar variados micro habitats, reforçando a ideia de que possam existir

variações de população para população dentro de uma mesma bacia (Garutti e Britski, 2000; Penteadó, *et. al.*, 2011).

Ambientes conservados possuem características ambientais mais estáveis, o que favorece o estabelecimento, adaptação e desenvolvimento de uma população (Frankham, *et. al.*, 2002). Isso ocorre no caso da população do Parque de Exposições, que possui clara distinção das demais populações analisadas. A localidade desse ponto é em uma área verde dentro da cidade de Rio Paranaíba, a qual não sofre intervenções humanas constantes que prejudiquem a conservação do local, visto que o manancial de abastecimento de água da cidade depende desse córrego. Além disso, o isolamento da população é evidente, já que, além de ser um espaço pequeno, conta com mais uma barreira geográfica no curso para outros rios, uma queda d'água de menor escala. Isso faz com que a dificuldade de fluxo gênico com outras populações seja ainda maior, assim como uma possível migração no período reprodutivo da espécie. O isolamento da população fez com que as diferenças genéticas acumuladas ao longo do tempo fossem mais evidenciadas quando comparadas às outras populações analisadas neste trabalho.

Sabe-se que o ambiente influencia diretamente no fenótipo das espécies, podendo causar diferenciações ao longo do tempo em populações isoladas (Peres-Neto, 1999; Strelman e Danley, 2003). A capacidade de uma mesma espécie se adaptar a diferentes ambientes é relacionada com a plasticidade fenotípica, a qual é presente e bem evidente no gênero *Astyanax* (De Souza *et. al.*, 2015). O gênero também é conhecido por possuir espécies com morfologia bem semelhante, causando problemas em termos de taxonomia (Garutti e Britski, 2000).

A plasticidade fenotípica pode ser evidenciada até mesmo entre populações de uma mesma bacia hidrográfica (Caramashi, 1986), e pode resultar em diferenças morfológicas entre as populações, geralmente moduladas por pressão ambiental local. Sendo assim, a forma do corpo de um indivíduo e suas alterações, estão correlacionadas com as questões influenciadoras do ambiente em que são encontrados (Abilhoa, 2007). Os resultados das análises de morfometria geométrica não evidenciaram a distinção da maioria das populações, com exceção da população do Parque de Exposições (Figura 8). Os pontos de coleta definidos se localizam em regiões próximas (Figura 3) com algumas ligações entre si e pressões ambientais relativamente parecidas, como por exemplo córregos de correnteza relativamente rápida. Sendo assim, espera-se que as respostas fenotípicas das populações também sejam semelhantes, resultando na

inexistência de uma distinção clara entre elas em termos de morfometria (Peres-Neto, 1999).

Alterações morfológicas e genéticas não necessariamente acontecem no mesmo tempo evolutivo. Existem pesquisas que demonstram exemplos em que uma delas já está evidenciada, e a outra ainda não. Um estudo feito por Lima (2016), demonstra uma morfologia comparativa entre *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*. Os resultados evidenciam a clara distinção morfológica entre as duas espécies, apesar de serem bem próximas geneticamente, já que possuem uma distância intra-específica menor que 2% (valor mínimo para distinção entre duas espécies) (April, *et al.*, 2013; Lima, 2016). De fato, em *A. fasciatus* foi observado que mesmo a mudança cromossômica antecipa a mudança molecular, causando anacronismos evolutivos (Kavalco *et al.*, 2016).

O shape consenso gerado para a *A. paranae* (Figura 8) demonstra um corpo mais fusiforme, curto e alto, fenótipo que favorece a natação e o equilíbrio em ambientes que possuem a velocidade média da água relativamente rápida, como é o caso dos riachos da Bacia do Paraná (Atlas das Águas, 2018).

Os resultados das análises das sequências do gene *cyt b* para as nove populações analisadas demonstraram a estruturação mais evidente de algumas populações, enquanto outras estiveram mais dispersas. As relações definidas entre as populações têm como base principalmente a proximidade dos pontos, assim como sua conectividade ao longo dos cursos d'água (Figura 3). Os resultados inferidos pela rede de haplótipos corroboram as conexões do filograma da análise Bayesiana, e servem de premissa para os estudos filogeográficos de *A. paranae* na bacia do alto rio Paranaíba.

A população do Rio Paranaíba, foi uma das populações que se mostraram com maior diversidade haplotípica, podendo, assim, ser caracterizada como o centro dispersor das populações. Além disso, seus haplótipos se conectam no centro da rede (Figura 7). Há relação entre a distribuição dessa população com a do rio São João, ligando as duas com o compartilhamento de um mesmo ancestral. Porém, pela distribuição e formação dos haplótipos, infere-se que em algum dado momento, a população do rio São João se isolou, enquanto houve a dispersão dos indivíduos do Rio Paranaíba, resultando na perda do haplótipo ancestral (Funk e Omland, 2003) e permanência deste na população do rio São João. A dispersão dos indivíduos do Rio Paranaíba é facilitada pela existência de vários riachos próximos.

As populações do riacho Água Grande, córrego do Parque do Zarico e do Buraco, Ribeirão do Quilombo e Riacho Olhos d'água, possuem um haplótipo diferente para cada indivíduo, corroborando com algumas das informações geradas pelo filograma da inferência Bayesiana (Figura 5). Os resultados podem estar relacionados com a utilidade dos locais, podendo estes serem pontos de reprodução ou até mesmo de encontro de subpopulações oriundas de outros córregos próximos. Os indivíduos vindos do Parque do Zarico, foram todos coletados em período de reprodução. Aplicando-se a ideia de migrações curtas realizadas nesse período, os resultados se confirmam, já que a separação dos haplótipos da população pode estar diretamente relacionada às migrações durante o período reprodutivo (Suzuki *et al.*, 2004).

Um fato que contribui para tais dados está relacionado ao tamanho dos cursos d'água das populações. Os maiores, como Rio Paranaíba e São João, oferecem uma gama maior de recursos, conseguindo abrigar simultaneamente várias populações e/ou indivíduos sem que a competição seja intensificada (Begon *et. al.*, 2007). Em riachos com volumes menores, como é o caso, por exemplo, do Parque do Zarico e Água Grande, a quantidade de recursos oferecida é menor, o que deve ter intensificado a ocorrência de migrações constantes pela busca de recursos.

No centro da rede nota-se a maior diversidade haplotípica, enquanto que nas periferias essa diversidade diminui. Isso pode ser explicado baseando-se na premissa dada pela “Teoria da Biogeografia de Ilhas” (MacArthur e Wilson, 1967) e “Teoria do Coalescente” (Posada e Crandall, 2001). Segundo a primeira, áreas maiores apresentam maior diversidade do que as menores, assim como em áreas próximas a locais que podem fornecer migrantes. A segunda explica a distribuição dos haplótipos na rede, ressaltando que um único haplótipo ancestral pode dar origem à vários descendentes e, assim, permitindo a compreensão de relações ancestrais e distribuição geográfica.

Embora tenha apresentado grande diversidade, populações pequenas e “fechadas”, como a do Parque de Exposições, tendem a enfrentar sérios problemas com perda de diversidade genética e aumento da endogamia. Isso, em conjunto, faz com que a habilidade de responder às alterações do ambiente e se adaptar sejam reduzidas, dificultando a permanência de uma população num local (Hedrick, 2000). Além disso, a homogeneidade genética entre os indivíduos causada pelo alto índice de endogamia, pode levar à eliminação ou redução drástica da população frente a eventos estocásticos que podem acontecer no ambiente, como por exemplo o desmatamento e diminuição da

área para permanência e adaptação dos indivíduos. Em populações de tamanho reduzido, os efeitos da deriva genética também são maiores, causando impactos ainda maiores na evolução destas (Frankham *et. al.*, 2002).

Juntamente com isso, entram as questões relacionados com a fragmentação de hábitat e a consequente migração reduzida, as quais influenciam diretamente na redução do fluxo gênico e aumenta o isolamento entre as populações. Ao longo do tempo isso gera uma clara diferenciação entre populações de uma mesma espécie, causando divergências genéticas e até mesmo morfológicas (Allan e Castillo, 2007). As consequências geradas por esses problemas podem ser diminuídas com práticas de conservação e proteção ao ambiente.

Uma população que segue alguns padrões condizentes com a do Parque de Exposições em termos dos efeitos da conservação na diferenciação genética é a do Córrego do Zarico. Também se trata de uma população pequena e restrita, localizada muito próxima da população do Parque de Exposições, porém seu grau de isolamento é menor e é um ambiente que sofre intervenções constantes no meio, o que dificulta a permanência e adaptação dos indivíduos. Os resultados das análises demonstraram a não estruturação (Figura 5) dessa população, não diferenciando-a das demais.

Diante disso, assume-se que a avaliação dos efeitos da fragmentação de habitat, desmatamento e até mesmo das intervenções humanas sobre a estruturação e diversidade genética de uma população é um meio importante e eficaz de tomar decisões acerca da conservação do ambiente (Galetti, *et. al.*, 2008).

6) Considerações finais

Awise (2000), com base na distribuição geográfica e grau de divergência apresentada pelos haplótipos de DNA mitocondrial, dividiu a filogeografia em categorias capazes de caracterizar a distribuição das populações e outros fatores (Teixeira, 2011). A primeira inclui linhagens bem divergentes, as quais se distribuem em áreas distintas (alopatria); a segunda relaciona linhagens divergentes de uma mesma área (simpatria); na terceira estão presentes linhagens de áreas geográficas diferentes (alopatria), porém com pouca divergência entre elas; as incluídas na quarta são aquelas linhagens com baixa ou nenhuma divergência e que se desenvolvem em simpatria; por

fim, na quinta categoria, intermediária entre a terceira e a quarta, encontram-se aquelas linhagens que possuem pouca divergência e separação geográfica parcial.

A exceção é a população habitante do Parque de Exposições, que apesar de possuir uma diferença muito sutil no *shape*, apresenta profunda estruturação genética, ultrapassando o limite estabelecido para espécie. Segundo o limiar de 2%, proposto por April *et al.* (2013), é muito provável que trate-se de uma unidade taxonômica operacional diferente de *A. paranae*, sendo necessários mais estudos para avaliar essa evidência inicial. Vale a pena ressaltar o caráter diferenciado desta população com relação à preservação do ambiente em que se encontra, e o fato de que, ao longo do tempo evolutivo, pode evoluir para uma nova espécie presente à sua diferenciação das demais populações.

Diante disso, e por todos os dados apresentados, conclui-se que *Astyanax paranae*, pode ser considerado pertencente à terceira categoria de Avise, já que apresenta pouca divergência entre as populações estudadas, as quais se encontram em espaços distintos e definem a condição de alopatria da espécie. Os resultados encontrados demonstram a eficácia de análises moleculares e morfológicas em definir as relações evolutivas entre populações, dando crédito à sua utilização em estudos filogeográficos. Além disso, possibilitam resgatar um pouco do conhecimento da história evolutiva da espécie na bacia, assim como sua diferenciação e estruturação genética, o que pode ser aplicado em estratégias de manejo e conservação da mesma.

7) Referências bibliográficas

ABILHOA, V. (2007) Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 24, n. 4, p. 997-1005.

ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. (2007) Stream of ecology: structure and function of running waters. 2 ed. Dordrecht: Springer.

ALVES, A. L. & MARTINS-SANTO, I. C. (2002) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia*, v. 67: 117-122.

ANA. Agência Nacional de Águas. (2008) Ministério do Meio ambiente. Disponível em: <<http://www.ana.gov.br>>.

APRIL, J., HANNER, R. H., DION-COTE, A.-M., & BERNATCHEZ, L. (2013). Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes. *Molecular Ecology*, 22(2), 409–422.

ARIAS, M. C. & W. S. SHEPPARD. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 557-566.

ATLAS DIGITAL DAS ÁGUAS DE MINAS. (2009) Panorama Hídrico – Regiões hidrográfica – UPGRH. http://www.atlasdasaguas.ufv.br/unidades_de_planejamento_e_gestao_dos_recursos_hidricos_home.html. Accessed 02 August, 2017.

AVISE, J. C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York, Chapman & Hall. Xiv + 511p.

AVISE, J. C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

AVISE, J. C.; J. ARNOLD; R. M. BALL; E. BERMINGHAM; T. LAMB; J. E. NEIGE; C. A. REEB e N. C. Saunders. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

AVISE, J. C. (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual review of genetics*, v. 25, n. 1, p. 45-69.

BANDELT H-J, FORSTER P, ROHL A. (1999) Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37–48.

BARTLETT, SE; DAVIDSON WS. FINS. (1992) (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12:408–11.

BEGON, M.; HARPER, J. L. & TOWNSEND C. R. (2007) *Ecologia - De indivíduos a ecossistemas*. 4 ed. Porto Alegre. Artmed. 752p.

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

BOOKSTEIN, F. L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.

BRANICKI, W.; KUPIEC, T., & PAWLOWSKI, R. (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of forensic sciences* 48(1), 83-87.

BRITSKI, H. A. (1972) Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática, poluição e piscicultura p. 79-108.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y; ROSA, ALBERT, BS. (1984) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. Câmara dos Deputados/CODEVASF.

CAMPOS, J. E. G.; DARDENNE, M. A. (1997) Origem e evolução da Bacia Sanfranciscana. *Brazilian Journal of Geology* v. 27, n.3: 283-294.

CARAMASCHI, E. P. (1986). Distribuição da ictiofauna de riachos das Bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 245P.

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

CASTRO, R. M. C. (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed.). *Ecologia de Peixes de Riachos*. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 139-155.

CHERNOMOR, O.; von HAESELER, A., & MINH, B. Q. (2016). Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic biology*, 65(6), 997-1008.

COSTA F.J.C.B, SÁ M.F.P. (1979) Estudo morfométrico e merístico do bagre mandim, *Arius spixii* (agassiz) (Pisces-Ariidae) da lagoa Manguaba *Bol. Núcleo. Ciência. Mar.* Maceió, BRA: Universidade Federal de Alagoas, v.1, p.7-15.

DAWYNDT, P; DE MEYER, H.; DE BAETS, B. (2006) UPGMA clustering revisited: A weight-driven approach to transitive approximation. *International Journal of Approximate Reasoning* v. 42, n. 3, p. 174-191.

- DE SOUZA, F., ZUANON, L. A., FROTA, A., JUNIOR, L. F. P., & DA SILVA, H. P. (2015). Variação ecomorfológica em populações de *Astyanax aff. paranae* Eigenmann, 1914, na bacia do alto Rio Paraná. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)* v. 5, n. 3, p. 44-49.
- DESORDI, R., DA SILVA REIS, D. G., KAVALCO, K. F., & PAZZA, R. (2012) Variabilidade morfológica e estruturação populacional de lambaris do grupo “*Astyanax aff. bimaculatus*” (Teleostei, Characiformes). DOI: 10.7902/ecb.v2i1.29. *Evolução e Conservação da Biodiversidade* 2(1), 73-78.
- DONNELLY, P. & TAVARÉ, S. (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*. 18, 1–19
- DRYDEN, Ian L.; MARDIA, K. V. (2016) Statistical shape analysis: with applications in R. John Wiley & Sons.
- EIGENMANN I, C. H. (1914) Some results from studies of South American fishes. IV. *New genera and species of South American fishes*. Indiana University Studies, 20: 44-48.
- EIGENMANN, C. H. (1917) The American Characidae. Part 1. *Memoirs of Museum of Comparative Zoology* n. 43, p. 1-102.
- EIGENMANN, C. H. (1917) The American Characidae. Part 3. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology* n. 43, 209–310.
- ESCHMEYER, W.N. (ed.), (2018) Catalog of fishes. Updated internet version of 05 March 2015. <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/>.
- ESCHMEYER, W.N. & FONG, J.D. (2009) Species of Fishes by family/subfamily, ver. 13 March 2009. World Wide Web electronic publication. *Evolution*, 8(4), 129-132.
- FARIAS, I. P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H., & MEYER, A. (2001). The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, v. 53, n. 2, p. 89-103, 2001.
- FERNANDES F.A; FORNEL R; CORDEIRO-ESTRELA P & FREITAS T.R.O. (2009) Intra- and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zoological Journal of the Linnean Society* 155: 220–237.
- FERREIRA, A. (2004) Ecologia trófica de *Astyanax paranae* (Osteichthyes, Characidae) em córregos da bacia do rio Passa-cinco, Estado de São Paulo. 56 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, Universidade de São Paulo/USP, Piracicaba.
- FLAUZINO, F. S., SILVA, M. K. A., NISHIYAMA, L., & ROSA, R. (2010) Geotecnologias aplicadas à gestão dos recursos naturais da bacia hidrográfica do rio Paranaíba no cerrado mineiro. *Sociedade e Natureza* 22 (1), 75-91.

- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- FUNK D.J, OMLAND K.E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397-423.
- GALETTI JR, P. M., RODRIGUES, F. P., SOLÉ-CAVA, A., MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D., EIZIRIK, E., & Oliveira, L. R. (2008) Genética da conservação brasileira. *Fundamentos de Genética da Conservação*. In: Frankham, R, 290.
- 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, SP, viii + 286 pp.
- GARUTTI, V., & BRITSKI, H. A. (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia* 13, 65-88.
- GODOY, M. P. (1975) Peixes do Brasil: subordem Characoidei, bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana.
- HAMMER O; HARPER D.A.T; RYAN P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4, 9.
- HAMMER, R.; HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis—Palaeontol. Elect. 4, 9 pp.
- HEBERT, P. D. N.; GREGORY T. R. (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Molecular Systems Biology* 54:852–859.
- HEDRICK, P. W.; KALINOWSKI, S. T. (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics*, v. 31, n. 1, p. 139-162.
- HUDSON, R.R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford surveys in evolutionary biology* 7, 1–4
- JAVONILLO, R.; L.R. MALABARBA; S.H. WEITZMAN e J.R. BURNS. (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(2):498-511.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDAO, K. D. O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L. A. C., & de ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2016). Chromosomal diversification higher than molecular variation in *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish*, 13(4), 345-353.

KENDALL, D. G. (1977) "The diffusion of shape." *Advances in applied probability* 9.3: 428-430

KLINGENBERG, C. P. (2002) Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287, 3–10. 8.

KLINGENBERG, C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Res.* 11, 353-357.

KLINGENBERG, C. P.; BARLUENGA, M.; MEYER, A., & WAINWRIGHT, P. (2002) Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* (N. Y). 56, 1909–1920.

KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F. X., & WILSON, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(16), 6196-6200.

KUMAR, R., PANDEY, B. K., SARKAR, U. K., NAGPURE, N. S., BAISVAR, V. S., AGNIHOTRI, P., ... & KUMAR, N. (2017) "Population genetic structure and geographic differentiation in butter catfish, *Ompok bimaculatus*, from Indian waters inferred by cytochrome *b* mitochondrial gene." *Mitochondrial DNA Part A* 28.3: 442-450.

LANFEAR, R.; CALCOTT, B.; HO, S. Y., & GUINDON, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.

LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A., PAVANELLI, C. S., & CASATTI, L. (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropical* 7(3), 1-17.

LARA, M. C., J. L. PATTON, & M. N. DA SILVA. (1996) The simultaneous diversification of South American *echimyid* rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 5:403–413.

LIBRADO P, ROZAS J. (2009) DnaSP v5: a software of comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 – 1452.

LIMA, F.C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. (2003) Genera Incertae Sedis in Characidae. IN: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr., C. J. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p 106-169.

LIMA, P. A. (2016) Morfologia comparativa de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) através de análises de morfometria geométrica.

- LOWE-MCCONNELL R. H. (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* 1: 51-75.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. (1999) Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Editora da USP, São Paulo, 535p.
- MACARTHUR, R. H. & WILSON, E. O. (1967) The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton.
- MAISTRO, E. L., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (1998) Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* 21(2), 201-206.
- MARRETA, M. E. (2011) Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial.
- MARTINS, F. M., & DOMINGUES, M.V. (2011) Filogeografia. Em Carvalho, C.J.B., Almeida E.A.B. (Eds). Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos. São Paulo: Editora Roca.
- MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) a species complex. *Rev Brasil Genetic* 142: 331–357.
- MORITZ, C.; T. E. DOWLING & W. M. BROWN. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.
- MOYSES, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2002) Restriction Fragment Length Polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* v. 25, n. 4, p. 401-407.
- NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; von HAESLER, A., & MINH, B. Q. (2014). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268-274.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. & HILSDORF, A. W. S. (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* v. 35, p. 81-100.
- PARSON, W.; PEGORARO, K.; NIEDERSTÄTTER, H.; FÖGER, M., & STEINLECHNER, M. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, v. 114, n. 1-2, p. 23-28.
- PENTEADO, P. R. (2011) Diversidade cromossômica e molecular no gênero *Astyanax* (Characiformes: Characidae).
- PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A. & DOADRIO, I. (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25(1): 172-189.

- PERDICES, A.; CUNHA, C. & COELHO, M. M. (2004) Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 31, n. 1, p. 192-203.
- PERES-NETO, P. R. (1999) Alguns métodos e estudos em ecomorfologia de peixes de riacho. In: Caramaschi, E. P.; Mazzoni, R.; Peres-Neto, P. R. Ecologia de peixes de riachos. *Oecologia Brasiliensis*, vol. VI. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 209-236.
- PORTO-FORESTI F.; OLIVEIRA C.; MAISTRO E. L. & FORESTI F. (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics* 20:377-380.
- POSADA, D., & CRANDALL, K. A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology e Evolution* 16(1), 37-45.
- PRIOLI, S. M.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V. D.; CARRER, H., ... & PRIOLI, L. M. (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25(4), 421-430.
- PURDOM, C. E. (1993) Genetics and Fish Breeding. Chapman & Hall. London, UK. 277p.
- REIS R. O.; KULLANDER S. O. & FERRARIS Jr. C. J. (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 742p.
- RICHARDSON, M. (2009) Principal component analysis. Mathematical Modelling and Scientific Computing, University of Oxford, Oxford, UK.
- ROHLF, F. J., & MARCUS, L. F. (1993) A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8(4), 129-132.
- ROHLF, F.J. (2013). tpsUtil version 1.6. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- ROHLF, F.J. (2015) tpsDig, version 2.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- SIDLAUSKAS B. (2008) Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of Characiform fishes: A phylomorphospace approach. *Evolution* 62:3135–3156.
- SILVA, D. M. D. A.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2016) The complete mitochondrial genome sequence of *Astyanax paranae* (Teleostei: characiformes). *Mitochondrial DNA Part B*, v. 1, n. 1, p. 586-587.

- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- STONE, G. N.; NEE, S., & FELSENSTEIN, J. (2011) Controlling for non-independence in comparative analysis of patterns across populations within species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366(1569), 1410-1424.
- STREELMAN J.T & Danley P.D. (2003) The stages of vertebrate evolutionary radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 18:126–131.
- SUZUKI, H. I.; VAZZOLER, A. E. A. M.; MARQUES, E. E.; LIZAMA, M. A. P.; INADA, P. (2004) Reproductive ecology of the fish assemblage. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A.; Hanh, N. S. (Ed.). The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. *Leiden: Backhuys Publishers* p. 271-292
- TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N; STECHER G.; NEI M. & KUMAR S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- TEIXEIRA, A. F. (2011) Análise da variabilidade e estruturação genética do tubarão azul, *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) no Oceano Atlântico Sul Ocidental utilizando marcador molecular do DNA mitocondrial.
- THOMPSON J. D.; HIGGINS D. G.; GIBSON T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- WAINWRIGHT, Peter C.; REILLY, Stephen M. (Ed.) (1994) Ecological morphology: integrative organismal biology. University of Chicago Press.
- WILSON, A. C.; R. L. CANN; M. GEORGE; U. B. GYLLENSTEN; K. M. HELMBYCHOWSKI; R. G. HIGUSHI; E. M. PALUMBI; R. D. SAGE & M. STONEKING. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of Linnean Society* 26: 375-400.
- WOLD, S. (1978) Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics* v. 20, n. 4, p. 397-405.
- ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D. (2012). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press.
- ZHU, Y.; QIQUN C., & SEAN M. R. (2016) "Genetic structure of *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae) along the coast of China revealed by complete mitochondrial cytochrome *b* sequences." *Mitochondrial DNA Part A* 27. 3828-3836.

Anexos:

Tabela 4: descrição dos haplótipos resultantes da análise de rede das sequências do gene *cyt b*. SJ2: Rio São João; RP1: Rio Paranaíba; PE: Parque de Exposições; AG5: Água Grande P5; ZAR: Zarico/Lava-Pés; BU: Buraco; F2: Ribeirão de Fora; Q2: Quilombo; OD2: Olhos d'água.

Número do haplótipo	Indivíduos pertencentes ao haplótipo	Número do haplótipo	Indivíduos pertencentes ao haplótipo
1	3475 OD2	16	2891 SJ2
2	3765 BU	17	2997 PE
3	3563 Q2	18	2998 PE
4	3477 BU	19	3000 PE
5	3568 Q2	20	3001 PE; 3002 PE; 3003 PE
6	3573 Q2	21	3071 ZAR
7	2877 SJ2, 2889 SJ2, 2890 SJ2	22	3072 ZAR
8	2878 SJ2	23	3073 ZAR
9	2879 SJ2	24	3153 AG5
10	3478 OD2	25	3165 AG5; 3261 RP1
11	3674 F2	26	3170 AG5; 3247 RP1; 3251 RP1; 3252 RP1; 3256 RP1; 3257 RP1; 3258 RP1
12	3676 F2	27	3249 RP1
13	3680 F2	28	3250 RP1
14	3760 BU	29	3259 RP1
15	3761 BU		