

RENAN RODRIGUES ROCHA

***Astyanax rivularis*: FERRAMENTAS PARA A AVALIAÇÃO DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA 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

R672a  
2019

Rocha, Renan Rodrigues, 1995-

*Astyanax rivularis*: ferramentas para a avaliação da diversidade genética e conservação da espécie / Renan Rodrigues Rocha. – Florestal, MG, 2019.

x, 27f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Karine Frehner Kavalco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Florestal.

Referências bibliográficas: f.22-27.

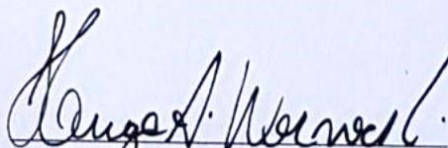
1. Peixes. 2. Genes mitocondriais. 3. Filogeografia.  
I. Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Florestal. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários. II. Título.

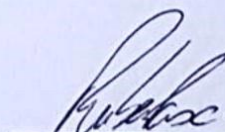
RENAN RODRIGUES ROCHA

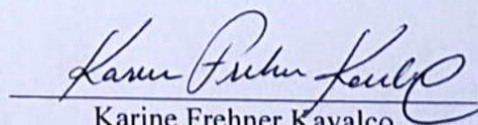
***Astyanax rivularis*: FERRAMENTAS PARA A AVALIAÇÃO DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

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: 27 de fevereiro de 2019.

  
Hugo de Azevedo Werneck

  
Rubens Pasa

  
Karine Frehner Kavalco  
(Orientadora)

*“O mundo sempre parece mais brilhante quando você acaba de fazer algo que não estava lá antes.”*

*(Neil Gaiman)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente não posso deixar de agradecer aos meus pais, Neide Soledade e João Roberto, pela confiança, pelo amor que me deram e por sempre me apoiarem as minhas escolhas. Sem o apoio incondicional que vocês sempre me deram, nada disso seria possível.

Aos meus familiares, que também sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, por torcerem por mim e estarem presentes quando eu necessitei.

A meus orientadores ao longo da minha jornada pela UFV, Dra Karine Frehner Kavalco e Dr Rubens Pazza. Obrigado por acreditarem no meu potencial, pela orientação na graduação e pós-graduação e por serem responsáveis por eu amar cada vez mais a ciência, mesmo com os percalços pelo caminho. Obrigado também por serem pessoas maravilhosas, que se preocupam com seus orientados tanto dentro quanto fora do ambiente de laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo), pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso, pelas ótimas conversas e pela amizade.

Agradeço principalmente aos companheiros pós-graduandos Dinaíza, Rosana e Snaydia. São grandes amigos pessoais, companheiros de laboratório e para a vida. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, por me fazerem rir, por discutir meus trabalhos comigo. Toda essa jornada teria sido muito mais difícil sem a presença de vocês. Muito obrigado!

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura para a realização do meu trabalho, realização de coletas e pela liberação de recursos que tornaram a realização deste trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários e seus professores, pelas aulas maravilhosas e cheia de conhecimento que tive a oportunidade de frequentar; Aos secretários João Marcos e Edivânia, sempre disponíveis para sanar nossas dúvidas.

À Fapemig e ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

A todos, muito obrigado!

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. <i>Astyanax rivularis</i> , distribuição e diversidade .....	1
1.2. O Alto São Francisco .....	2
1.3. Marcadores Moleculares .....	3
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo geral .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	5
3.1. Coleta de material biológico.....	5
3.2. Extração de DNA .....	6
3.3. Amplificação dos genes mitocondriais .....	7
3.4. Análise dos dados mitocondriais .....	7
4.RESULTADOS.....	9
4.1. Amostras sequenciadas .....	9
4.2. Distâncias genéticas .....	9
4.3. Análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança .....	11
4.4. Rede de Haplótipos .....	14
5.DISSCUSSÃO.....	16
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de *Astyanax rivularis* .....2
- Figura 2.** **A)**Visão geral da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (Fonte: ANA – Agência Nacional das Águas). **B)**Localização dos pontos de coleta das populações de *A. rivularis* .....5
- Figura 3.** Inferência Bayesiana baseada no gene *CytB* gerado no software Mr Bayes. Os valores apresentados nos nós representam a probabilidade à posteriori calculada pelo software Mr Bayes, enquanto os valores entre parênteses representam o valor de bootstrap da Análise de Máxima Verossimilhança.....12
- Figura 4.** Inferência Bayesiana baseada no gene *ATPase 6/8* gerado no software Mr Bayes. Os valores apresentados nos nós representam a probabilidade à posteriori calculada pelo software Mr Bayes, enquanto os valores entre parênteses representam o valor de bootstrap da Análise de Máxima Verossimilhança.....13
- Figura 5.** Rede de Haplótipos gerada pelo software Network a partir das sequências de *ATPase 6/8*. O tamanho dos nós é proporcional à sua frequência. Cada traço representa um passo mutacional ocorrido entre os haplótipos. Cada população é representada por uma cor. Vermelho: Córrego Curral das Éguas; Rosa: Córrego Vereda Grande; Roxo: Rio do Boi; Verde escuro: Córrego Lambari; Laranja: Córrego Tiros; Azul escuro: Córrego Lage; Verde claro: Rio Abaeté; Cinza: Açude; Preto: haplótipos faltantes .....14
- Figura 6.** Rede de Haplótipos gerada pelo software Network a partir das sequências de *CytB*. O tamanho dos nós é proporcional à sua frequência. Cada traço representa um passo mutacional ocorrido entre os haplótipos. Cada população é representada por uma cor. Vermelho: Córrego Curral das Éguas; Rosa: Córrego Vereda Grande; Roxo: Rio do Boi; Verde escuro: Córrego Lambari; Laranja: Córrego Tiros; Azul escuro: Córrego Lage; Verde claro: Rio Abaeté; Cinza: Açude; Azul claro: Ribeirão Bandeirinhas. Preto: haplótipos faltantes .....15

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações sobre os pontos de coleta de populações de <i>Astyanax rivularis</i> e número de indivíduos sequenciados para cada região gênica.....	6
<b>Tabela 2.</b> Distância genética intrapopulacional para os genes <i>ATPase 6/8</i> e <i>CytB</i> . N/D = Não disponível .....	9
<b>Tabela 3.</b> Distância genética par a par de populações para o gene <i>ATPase 6/8</i> . Os valores abaixo da diagonal correspondem à distância entre os pares, enquanto os valores acima da diagonal (sombreados), correspondem ao erro-padrão para 1000 replicações .....	10
<b>Tabela 4.</b> Distância genética par a par de populações para o gene <i>CytB</i> . Os valores abaixo da diagonal correspondem à distância entre os pares, enquanto os valores acima da diagonal (sombreados), correspondem ao erro-padrão para 1000 replicações. C corresponde a Córrego. Curral d. E = Córrego Curral das Éguas; Vereda G = Córrego Vereda Grande; Rib Band = Ribeirão Bandeirinhas .....	10

## RESUMO

ROCHA, Renan Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - *Campus Florestal*, Fevereiro de 2018. ***Astyanax rivularis*: ferramentas para a avaliação da diversidade genética e conservação da espécie**. Orientadora: Karine Frehner Kavalco.

Peixes são o maior grupo de vertebrados vivos, com grande parte das espécies habitantes da Região Neotropical. Dentre as espécies existentes na região, o gênero *Astyanax* destaca-se devido à sua ampla distribuição, diversidade morfológica e cariotípica. O gênero possui caráter *Incertae sedis* na família e é caracterizado por um grande número de complexos de espécies. Um desses complexos é o *Astyanax scabripinnis*, composto por pelo menos 14 espécies de grande similaridade morfológica. Entre as espécies do complexo encontra-se *Astyanax rivularis*. Estes pequenos peixes normalmente restringem-se às cabeceiras dos rios, devido à dificuldade em superar barreiras como rápido fluxo de água. É uma espécie que possui poucos estudos sobre sua diversidade genética, estrutura populacional e filogeografia. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e presença de estruturação genética e inferir as relações filogeográficas de populações de *Astyanax rivularis* na bacia hidrográfica do Alto Rio São Francisco, utilizando marcadores moleculares mitocondriais. Para isso, foram extraídos DNA de fígado e coração de indivíduos de nove populações de *A. Rivularis*, sendo uma delas em área de Unidade de conservação (Parque Nacional da Serra do Cipó), que foram utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais Citocromo *B* e ATPsintase subunidades 6 e 8. As distâncias genéticas calculadas entre as populações foram similares às encontradas na literatura, com exceção para alguns indivíduos provenientes do Parque Nacional da Serra do Cipó. A distância genética maior que 2% para as outras populações, os agrupamentos encontrados nos dendrogramas e a existência de uma linhagem formada exclusivamente por estes indivíduos na rede de haplótipos traz evidências de que, provavelmente, trata-se de uma espécie diferente de *A. rivularis*. A distância genética dentro das populações foi baixa. Os dendrogramas mostram a existência de dois grandes clados para as populações. De forma geral, córregos que possuem conexão agruparam-se. Populações que possuem maior diversidade cariotípica mostraram maior estruturação em relação às outras. Entretanto, algumas populações exibiram indivíduos em ambos os clados. A rede de haplótipos para ambos os genes indica a existência de dois eventos de colonização nos rios amostrados. Um primeiro evento levou à colonização de uma linhagem nos rios,

enquanto um segundo evento levou ao aporte de uma outra linhagem em novos rios e em alguns dos rios previamente colonizados. O uso de abordagens com múltiplas ferramentas pode oferecer novas informações para elucidar a história evolutiva do grupo e verificar se realmente há a existência de mais de uma espécie sendo identificada como *A. rivularis*, o qual comporia mais um complexo de espécies no gênero *Astyanax*.

## ABSTRACT

ROCHA, Renan Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - *Campus Florestal*, February, 2018. ***Astyanax rivularis*: tools for assessment of genetic diversity and species conservation.** Adviser: Karine Frehner Kavalco.

Fishes are the biggest group of living vertebrates, with a large portion of them inhabiting the Neotropical Region. Among species from the region, the *Astyanax* genus stands out due to the large distribution and great morphological and karyotypic diversity. It's a genus *Incertae sedis* in Characidae family, is characterized by a huge number of species complexes. One of these complexes is *Astyanax scabripinnis*, comprised of at least fourteen species that share some morphological similarity. *Astyanax rivularis* is one of the species that belong to the complex, an endemic subspecies of the Upper São Francisco River Basin recently raised to the status of species. These minnows usually are restricted to headwaters because it has difficulty to overcome barriers like fast stream flow. Few studies are available about its genetic diversity, population structure and phylogeography. This work aimed to assess the genetic diversity, population structuring and to infer phylogeographic relationships of *A. rivularis* in the Upper São Francisco River Basin, using mitochondrial molecular markers. In order to achieve that, we have extracted DNA from the liver and heart of specimens from nine *A. rivularis*' populations, one of those located in an area of a Conservation Unit (Serra do Cipó National Park). These DNAs were used to amplify mitochondrial genes Cytochrome *B* and ATP synthase subunits 6 and 8. The genetics distances calculated among populations were according to literature, with exception of some specimens from Serra do Cipó National Park. The genetic distance greater than 2%, the clustering found on dendrograms and the existence of a unique lineage composed by these specimens presented partial evidence of another species than *A. rivularis*. The genetic distances within the populations were low. The dendrograms showed the existence of two major clades for populations. In general, streams with connections between them were clustered together. Populations that have greater karyotypic diversity presented stronger structuration than others. Nevertheless, some populations showed up individuals in both clades. The haplotype network for both genes indicated the occurrence of two colonization events in the sampled rivers. The first event led to the colonization of one lineage in the rivers, while the second event led to the colonization of a second lineage to new rivers and

to some of the previously colonized rivers. An approach with multiple tools might be useful to bring some new information that can be helpful to elucidate the evolutionary history of the species and to check if there are more than one species being labelled as *A. rivularis*, which would compose one more species complex within *Astyanax* genus.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Astyanax rivularis*, distribuição e diversidade

Os peixes são o maior grupo dentro dos vertebrados, compreendendo atualmente mais de 32 mil espécies, com uma grande diversidade de morfologias, hábitos de vida e comportamento (Nelson *et al.*, 2016). Cerca de 20% destas espécies, aproximadamente seis mil, encontram-se na Região Neotropical, sendo esta considerada a região com a mais rica ictiofauna (Reis *et al.*, 2003). Entre os peixes encontrados na região Neotropical, destacam-se os pertencentes a ordem Characiformes, com suas mais de 1800 espécies, e dentro desta temos a família Characidae, principal da ordem, com aproximadamente 1200 espécies.

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 é um gênero *Incertae sedis* que atualmente possui cerca de 160 nomes de espécies válidos (Eschmeyer e Fong, 2019) e distribui-se por toda a região Neotropical, sendo o mais diversificado da família Characidae (Orsi *et al.*, 2004). É um gênero com grande variação morfológica, comportamental, cariotípica e de habitats. Apesar dessa grande variação, muitas espécies do gênero são consideradas complexos de espécies, apresentando grande dificuldade na delimitação das espécies que os compõem (Pazza *et al.*, 2008; Kavalco *et al.*, 2009; Lucena e Soares, 2016).

Um dos complexos de espécies existentes dentro do gênero é o *Astyanax scabrippinis*. Inicialmente sugerido por Moreira-Filho e Bertollo em 1991 devido a diferenças cariotípicas, o complexo hoje engloba 14 espécies (Bertaco e Lucena, 2006), com número diplóide variando de  $2n = 46$  a  $2n = 50$  (Maistro *et al.*, 2000), apesar de trabalhos recentes indicarem que o complexo possa compreender mais espécies (Oliveira *et al.*, 2017, Zanata *et al.*, 2018).

Uma das espécies que se associa ao complexo é *Astyanax rivularis* Lütken 1874 (Figura 1), espécie endêmica da porção Alta da bacia do Rio São Francisco (Eschmeyer and Fong, 2019). São animais diurnos de pequeno porte, que se movem livremente na coluna d'água, nadando próximos às margens dos rios, vivendo nas cabeceiras dos cursos d'água (Casatti e Castro, 2006).

Devido a estas características e à dificuldade em superação de barreiras como fortes correntezas, os indivíduos de *A. rivularis* tendem a se isolar em concentrações populacionais e geográficas (Bennemann *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 2002). Dessa

forma, a própria calha do rio pode se tornar um impedimento abiótico ao livre deslocamento dos indivíduos, diminuindo o fluxo gênico entre as populações.

Devido ao hábito onívoro, são importantes para a manutenção da teia trófica do ambiente aquático, podendo controlar o tamanho populacional tanto de algas e insetos, como também servindo de alimento para peixes de maior porte (Uieda e Motta, 2007).



Figura 1 - Exemplar de *Astyanax rivularis*

Apesar de ser relativamente comum na bacia do Rio São Francisco, estudos genéticos, populacionais e filogeográficos sobre a espécie são escassos na literatura. Assim, a utilização de ferramentas variadas de biologia molecular pode oferecer uma gama de informações valiosas a respeito das espécies. Tais ferramentas são comumente utilizadas para esses propósitos, por se mostrarem informativas em detectar diversidade genética entre populações e/ou espécies (Castro *et al.*, 2015; Chistiakov *et al.*, 2006).

## 1.2 O Alto São Francisco

O Rio São Francisco corresponde à terceira maior bacia hidrográfica do Brasil, e a primeira contida inteiramente no país. A porção denominada como Alto São Francisco compreende desde a nascente do Rio São Francisco, na Serra da Canastra, até a foz do rio das Velhas, após a cidade de Pirapora - MG. É delimitada pelo lado direito pela Serra do Espinhaço e pelo lado esquerdo pela Serra da Mata da Corda (MMA, 2004). É uma região bastante chuvosa (de 1000 mm a 1500 mm anuais), com vegetação constituída de Cerrado e fragmentos de Mata Atlântica (Codevasf, 2010). É a porção da bacia do São Francisco com maior índice de enchentes, embora a construção de represas venha gradativamente diminuindo este índice (Santos *et al.*, 2012).

Enchentes são grandes modificadores da paisagem a que estão associadas. São responsáveis pelo carreamento de nutrientes, sedimentos, matéria orgânica e até

mesmo fauna e flora (Junk *et al.*, 1989). Com isso, podem ser responsáveis pela troca de faunas entre cursos d'água, formação de lagos, movimentação lateral (migração) e recrutamento e reprodução de espécies, sendo assim um fator que pode influenciar na estruturação de diferentes populações e espécies (King *et al.*, 2003; Pompeu e Godinho, 2003; Agostinho *et al.*, 2004; Lyon *et al.*, 2010).

### **1.3 Marcadores moleculares**

Estudos de diversidade genética dentro e entre populações utilizando marcadores moleculares são uma etapa inicial importante para se obter um panorama da diversidade dentro e entre espécies (Ashikaga *et al.*, 2015). São também essenciais para permitir a elaboração de programas de manejo e conservação de espécies (Frankham *et al.*, 2004).

Entre os marcadores moleculares usados para estes estudos encontram-se os polimorfismos em sequências de genes mitocondriais. Estes genes possuem características que os tornam úteis para diversos tipos de estudos populacionais, entre eles a ausência de recombinação e herança materna (Saccone, 1994), seu grau de conservação entre os táxons (Billington e Hebert, 1991) e sua taxa de evolução maior que a de genes nucleares de cópia única (Brown *et al.*, 1979).

Alguns dos genes utilizados para tais análises em peixes são o Citocromo B (*CytB*) (Perdices *et al.*, 2002) e ATP sintase subunidades 6/8 (*ATPase 6/8*) (Habib *et al.*, 2011). *CytB* é largamente usado no estudo de relações filogenéticas entre espécies de mesmo gênero ou família, com resultados que muitas vezes podem até mesmo modificar as relações filogenéticas dentro destes grupos. (Castresana, 2001). Já a *ATPase 6/8* é bastante utilizada em trabalhos de filogeografia e reconstrução de eventos evolutivos em peixes. (Borba *et al.*, 2013; Pazza *et al.*, 2018).

Dados obtidos pelas ferramentas supracitadas possuem uma grande gama de aplicações. Podem ser utilizados para uma série de análises genéticas individuais, populacionais e filogeográficas (Chistiakov *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a diversidade e estruturação genética e reconstruir a filogeografia de populações de *Astyanax rivularis* na bacia hidrográfica do Alto Rio São Francisco.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estimar a diversidade genética dentro e entre populações de *A. rivularis*.
- Estabelecer as relações evolutivas entre as diferentes populações de *A. rivularis* amostradas, considerando a distribuição das mesmas.
- Discutir os padrões e processos envolvidos na evolução do grupo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de material biológico

Indivíduos de populações de *Astyanax rivularis* foram coletados em nove pontos ao longo da Bacia do Alto Rio São Francisco, sendo um deles localizado em área de conservação do Parque Nacional da Serra do Cipó (Ribeirão Bandeirinhas). Os pontos de coleta estão indicados na figura 2. Todas as coletas foram realizadas com a licença permanente SISBIO 15571-1 atribuída a Rubens Pazza.

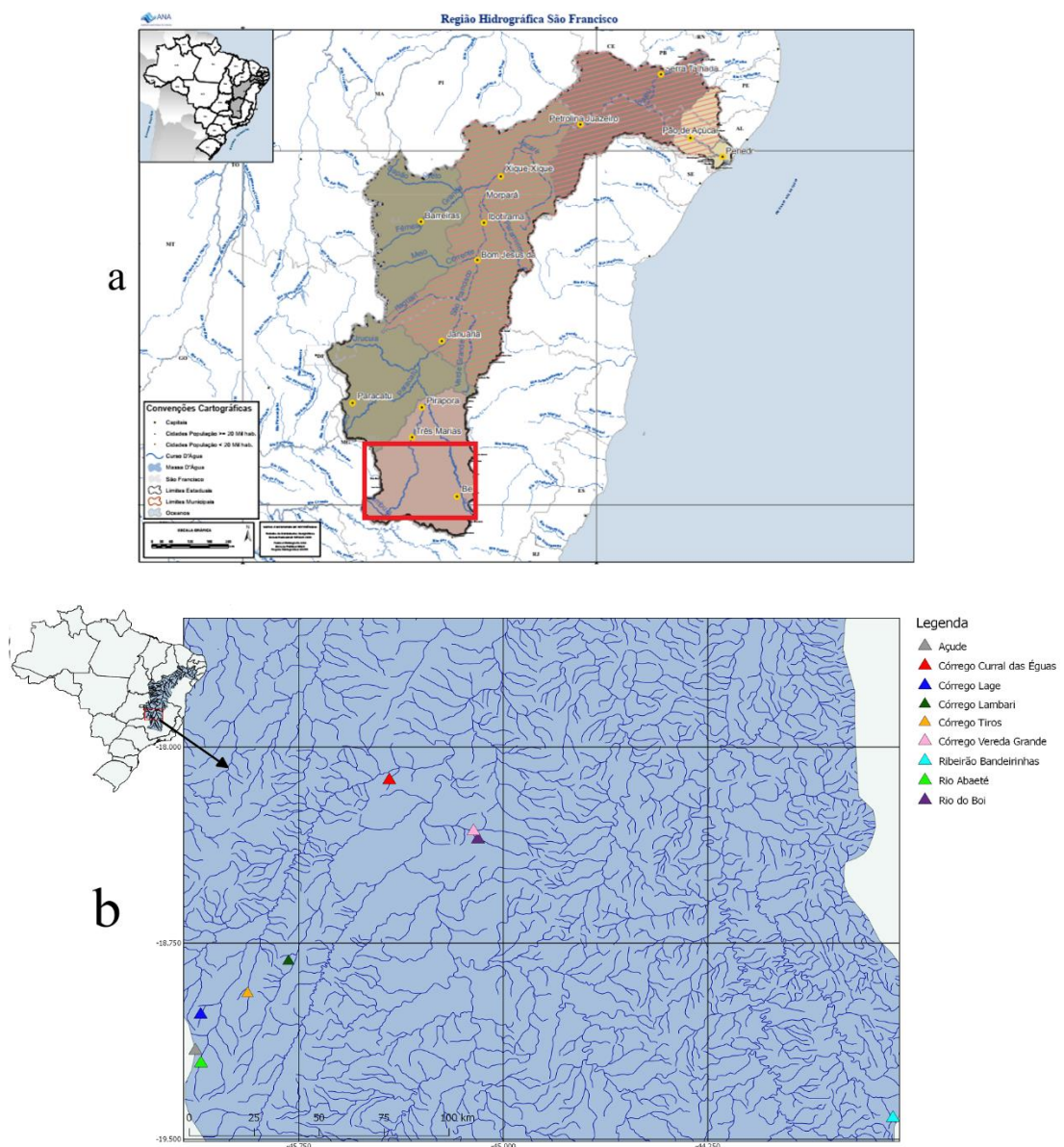


Figura 2a – Visão geral da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (Fonte: ANA – Agência Nacional das Águas). 2b – Localização dos pontos de coleta de *A. rivularis*

Os indivíduos capturados foram levados ao Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo), da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba (UFV-CRP), onde foram eutanasiados pela imersão dos espécimes em água com eugenol, conforme recomendado pela Resolução Normativa nº 37/2018 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CONCEA/MCTI). Após este procedimento foi realizada a retirada de tecidos para análises cromossômica e molecular. Os espécimes e as amostras retiradas foram depositados na Coleção de Vertebrados e Banco de Tecido e Suspensão Celular do LaGEEVO UFV-CRP. Todos os espécimes foram identificados como *Astyanax rivularis*. Na tabela 1 são apresentadas as coordenadas das populações usadas neste estudo, além da quantidade de sequências de DNA obtidas de cada uma delas.

Tabela 1 - Informações sobre os pontos de coleta de populações de *Astyanax rivularis* e número de indivíduos sequenciados para cada região gênica.

Populações	Coordenadas	<i>ATPase 6/8</i>	<i>CytB</i>
Córrego Lage	19°01'25.5"S, 46°06'38.2"W	2	4
Córrego Tiros	18°56'34.1"S, 45°56'18.2"W	5	5
Córrego Lambari	18°49'08.5"S, 45°47'17.7"W	4	5
Rio do Boi	18°19'03.9"S, 45°05'41.0"W	5	5
Córrego Curral das Éguas	18°07'36.2"S, 45°25'06.0"W	5	4
Córrego Vereda Grande	18°19'18.6"S, 45°06'32.8"W	4	5
Açude	19°09'39.9"S, 46°07'47.3"W	3	4
Rio Abaeté	19°12'35.7"S, 46°06'33.8"W	3	3
Ribeirão Bandeirinhas	19°25'08.3"S, 43°34'12.4"W	0	5

### 3.2 Extração de DNA

O DNA para as análises com marcadores moleculares foi extraído de fragmentos de tecidos como coração e fígado, utilizando um kit comercial de extração e purificação da Invitrogen, seguindo-se as instruções do fabricante. A checagem de qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1%, com a quantificação sendo realizada pela comparação com padrão de peso molecular conhecido.

### 3.3 Amplificação dos genes mitocondriais

Para amplificação dos genes mitocondriais foram utilizados os primers H16460- 5'CGAYCTTCGGATTACAAGAC3' e GluDG.L - 5' TGACCTGAARAACCAAYCGTT3' para amplificação do gene Citocromo B (Perdices *et al.*, 2002), e os primers ATP 8.2\_L8331 (5' AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC) e CO3.2\_H9236 (5' GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC) para amplificação do gene ATPase subunidades 6 e 8 (Sivasundar *et al.*, 2001). As condições das reações de amplificação foram: desnaturação inicial 94°C por 4 minutos (1 repetição), seguidos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), anelamento a 56°C por 30 segundos e alongamento 72°C por 2 minutos (35 repetições) e extensão final a 72°C por 1 minuto. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio, como intercalador e visualizados utilizando-se transiluminador. Quando bem-sucedidas, os produtos de amplificação foram enviados para empresa terceirizada, responsável pela purificação e sequenciamento das amostras pelo método de Sanger.

### 3.4 Análise dos dados mitocondriais

As sequências de cada gene foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) e editadas no software MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2013). Em cada alinhamento uma sequência do GenBank de *Astyanax paranae* para aquele gene foi adicionada como outgroup. As sequências dos genes de *A. paranae* foram obtidas do genoma mitocondrial completo da espécie (Silva *et al.*, 2016). No MEGA v.6 também foram calculados a distância genética intra-populacional e inter-populacional, a porcentagem de composição de base das sequências e o número de sítios polimórficos. O software PartitionFinder 2 (Lanfear *et al.*, 2016) com implementação do algoritmo greedy (Lanfear *et al.*, 2012) foi utilizado para definir o particionamento dos nucleotídeos em subconjuntos e calcular o melhor modelo de substituição a ser usado nas análises posteriores. O particionamento foi realizado em 1º, 2º e 3º posições do códons e os modelos encontrados foram HKY para *ATPase 6/8* e HKY+G para *CytB* (Hasegawa *et al.*, 1985).

A análise de máxima verossimilhança foi realizada no software IQ-Tree v 1.69 (Nguyen *et al.*, 2015) para ambos os genes, com 5000 réplicas e aproximação de bootstrap ultra-rápida, para a produção de dendrogramas com valores de suporte no

ramo mais confiáveis (Hoang *et al.*, 2017). A partição dos códons e modelos evolutivos utilizados foram os encontrados pelo software PartitionFinder 2.

A análise bayesiana foi realizada para ambos no software MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), com 50 milhões de gerações iniciais até o desvio padrão médio das frequências divididas ser menor ou igual a 0,001, sumarização dos parâmetros da corrida e sumarização das árvores geradas. O burnin, descarte de parte inicial das amostras, foi definido em 20%. Os modelos evolutivos utilizados foram os encontrados pelo software PartitionFinder 2. O software Tracer 1.7 (Rambaut *et al.*, 2018) foi utilizado para verificar a convergência dos parâmetros da análise. Os dendrogramas gerados tanto na análise de máxima verossimilhança quanto na análise bayesiana foram visualizados no software FigTree V1.4.3 (Rambaut, 2012).

A construção da rede de haplótipos foi realizada pela criação de um arquivo de dados de haplótipos a partir das sequências, utilizando o software DnaSP 5 (Librado e Rozas, 2009) com implementação de algoritmo de método bayesiana baseado em coalescência (Stephens *et al.*, 2001). O cálculo da rede de haplótipos por meio de abordagem median-joining (Bandelt *et al.*, 1999) foi realizado no software Network©.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostras sequenciadas

Foram obtidas 40 sequências do gene mitocondrial *CytB*, para as 9 populações estudadas, que tiveram uma média de 600 pares de bases, com composição média de 30,5% de Timina, 28,1% de Citosina, 25,6% de Adenina e 15,8% de Guanina. Foram detectados 49 sítios variáveis nas sequências. Para o gene da *ATPase 6/8* foram obtidas 31 sequências, para 8 populações, de tamanho médio de 609 pares de base, com 21 sítios variáveis e médias de 27,6% de Timina, 29,9% de Citosina, 29,3% de Adenina e 13,2% de Guanina.

### 4.2 Distâncias genéticas

A distância genética calculada entre indivíduos dentro de uma mesma população e entre diferentes populações estão apresentadas nas tabelas abaixo.

Tabela 2 – Distância genética intrapopulacional para os genes *ATPase 6/8* e *CytB*.

N/D = Não disponível

Populações	Distância genética	
	<i>ATPase 6/8</i>	<i>CytB</i>
Córrego Lage	0.000	0.000
Córrego Tiros	0.001	0.000
Córrego Lambari	0.010	0.009
Rio do Boi	0.000	0.000
Córrego Curral das Éguas	0.012	0.007
Córrego Vereda Grande	0.000	0.000
Açude	0.000	0.000
Rio Abaeté	0.000	0.002
Ribeirão Bandeirinhas	N/D	0.026

Devido à alta diversidade encontrada em Ribeirão Bandeirinhas, uma análise da distância genética foi aplicada entre os indivíduos da população. Foi observado grande diversidade entre alguns indivíduos, levando à sua separação em dois grupos, baseando-se num limite de 2% de diferença entre os indivíduos (April *et al.*, 2013; Rossini *et al.*, 2016). Estes grupos foram denominados Ribeirão Bandeirinhas “A” e “B”. O agrupamento Ribeirão Bandeirinhas “B” possui uma diferenciação quase no

limiar quando comparada às populações do Córrego Lage e Tiros, e maior que 2% quando comparada ao Ribeirão Bandeirinhas “A”.

Tabela 3 – Distância genética par a par de populações para o gene *ATPase 6/8*. Os valores abaixo da diagonal correspondem à distância entre os pares, enquanto os valores acima da diagonal (sombreados), correspondem ao erro-padrão para 1000 replicações.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Córrego Lage		0.002	0.003	0.002	0.004	0.002	0.006	0.006
2. Córrego Tiros	0.003		0.002	0.000	0.003	0.000	0.006	0.006
3. Córrego Lambari	0.007	0.006		0.002	0.003	0.002	0.005	0.005
4. Rio do Boi	0.002	0.000	0.005		0.003	0.000	0.006	0.006
5. Córrego Curral das Éguas	0.010	0.009	0.010	0.008		0.003	0.005	0.005
6. Córrego Vereda Grande	0.002	0.000	0.005	0.000	0.008		0.006	0.006
7. Açude	0.018	0.015	0.016	0.016	0.017	0.016		0.000
8. Rio Abaeté	0.018	0.015	0.016	0.016	0.017	0.016	0.000	

Tabela 4 - Distância genética par a par de populações para o gene *CytB*. Os valores abaixo da diagonal correspondem à distância entre os pares, enquanto os valores acima da diagonal (sombreados), correspondem ao erro-padrão para 1000 replicações. C corresponde a Córrego. Curral d. E = Córrego Curral das Éguas; Vereda G = Córrego Vereda Grande; Rib Band = Ribeirão Bandeirinhas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. C. Lage		0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.004	0.008	0.005
2. C. Tiros	0.006		0.003	0.002	0.003	0.002	0.005	0.005	0.007	0.005
3. C. Lambari	0.013	0.009		0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.007	0.004
4. Rio do Boi	0.006	0.004	0.008		0.003	0.000	0.004	0.004	0.007	0.004
5. Curral d. E	0.011	0.009	0.007	0.008		0.003	0.002	0.003	0.007	0.004
6. Vereda G	0.005	0.004	0.008	0.000	0.008		0.004	0.004	0.007	0.004
7. Açude	0.016	0.014	0.006	0.011	0.006	0.011		0.003	0.007	0.003
8. Rio Abaeté	0.013	0.015	0.011	0.012	0.011	0.011	0.007		0.007	0.003
9. Rib Band A	0.035	0.033	0.034	0.029	0.033	0.029	0.033	0.034		0.007
10. RibBand B	0.019	0.019	0.014	0.015	0.015	0.015	0.011	0.009	0.036	

Para ambos os genes, as únicas populações que apresentaram diversidade intra-populacional maior que 0 foram as populações do Córrego Lambari e Córrego Curral das Éguas. Ribeirão Bandeirinhas mostrou maior diversidade para o gene *CytB*. De uma forma geral, as populações do Rio Abaeté, Açude e Ribeirão Bandeirinhas foram as que apresentaram maior distância em relação às outras populações.

### **4.3 Análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança**

As análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança para ambos os genes geraram dendrogramas com topologias e probabilidade similares, com pequenas alterações relativas somente ao comprimento dos ramos. Dessa forma, serão apresentados apenas os dendrogramas gerados pela análise bayesiana com os valores de probabilidade e bootstrap para ambas análises (Figuras 3 e 4).

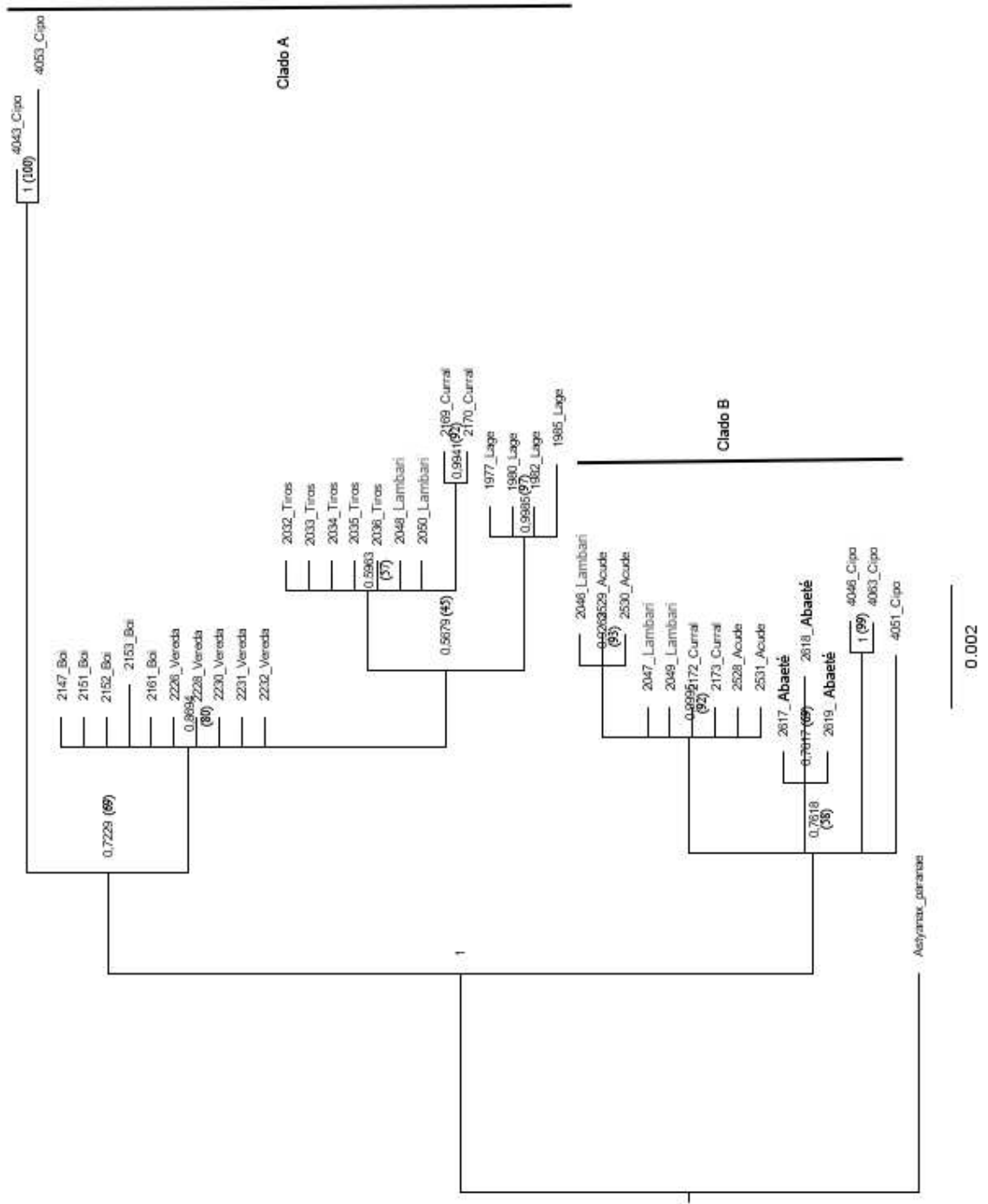


Figura 3 – Inferência Bayesiana baseada no gene *CytB* gerado no software Mr Bayes. Os valores apresentados nos nós representam a probabilidade à posteriori calculada pelo software Mr Bayes, enquanto os valores entre parênteses representam o valor de bootstrap da Análise de Máxima Verossimilhança.

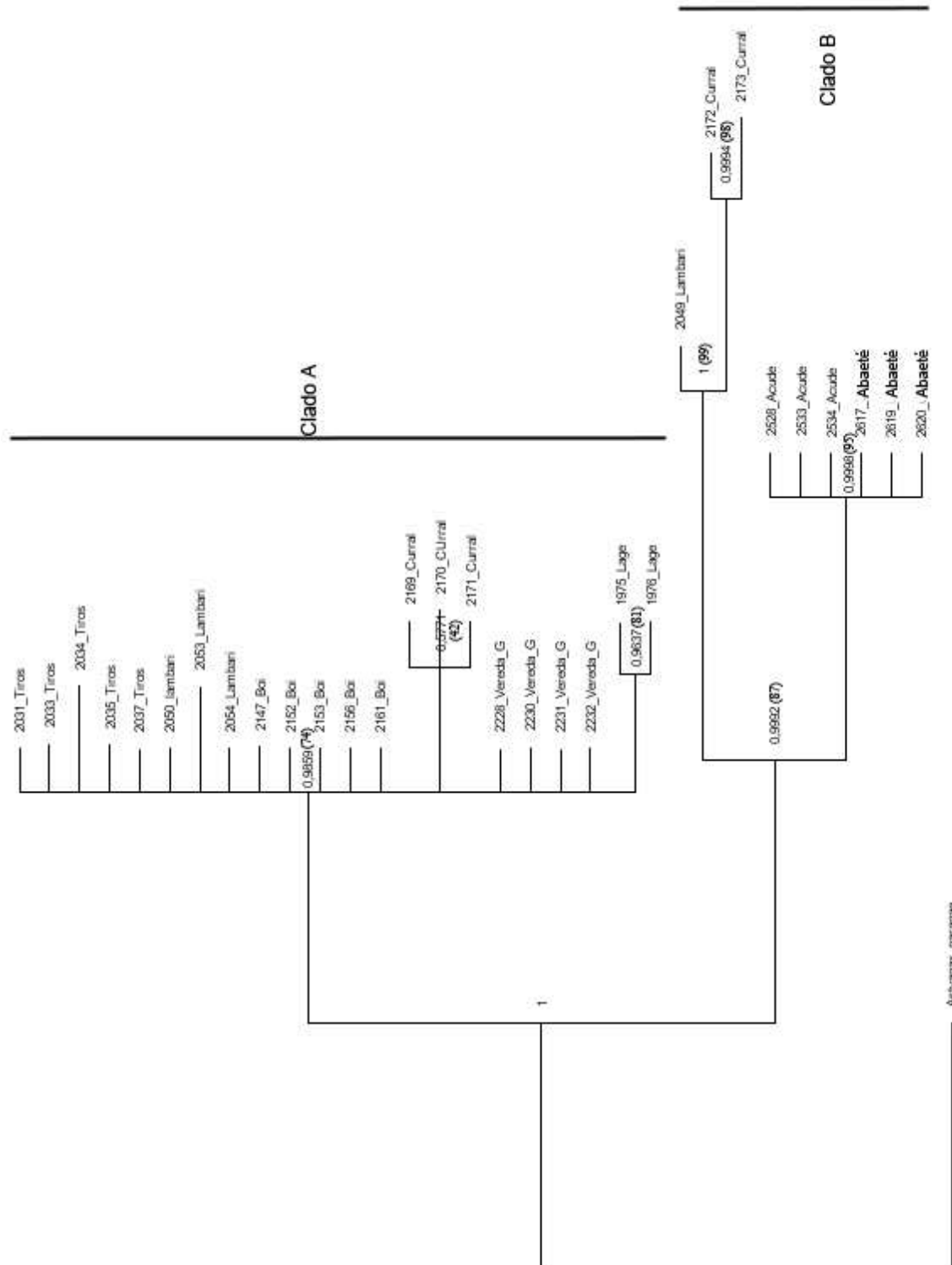


Figura 4 – Inferência Bayesiana para o gene *ATPase 6/8* gerado no software Mr Bayes. Os valores apresentados nos nós representam a probabilidade à posteriori calculada pelo software Mr Bayes, enquanto os valores entre parênteses representam o valor de bootstrap da Análise de Máxima Verossimilhança.

#### 4.4 Rede de Haplótipos

A rede de haplótipos gerada a partir das sequências de *ATPase 6/8* mostraram 3 principais linhagens derivadas de um haplótipo ancestral/não coletado (Figura 5). Foram encontrados 7 haplótipos e a diversidade haplotípica foi de 0,6344.

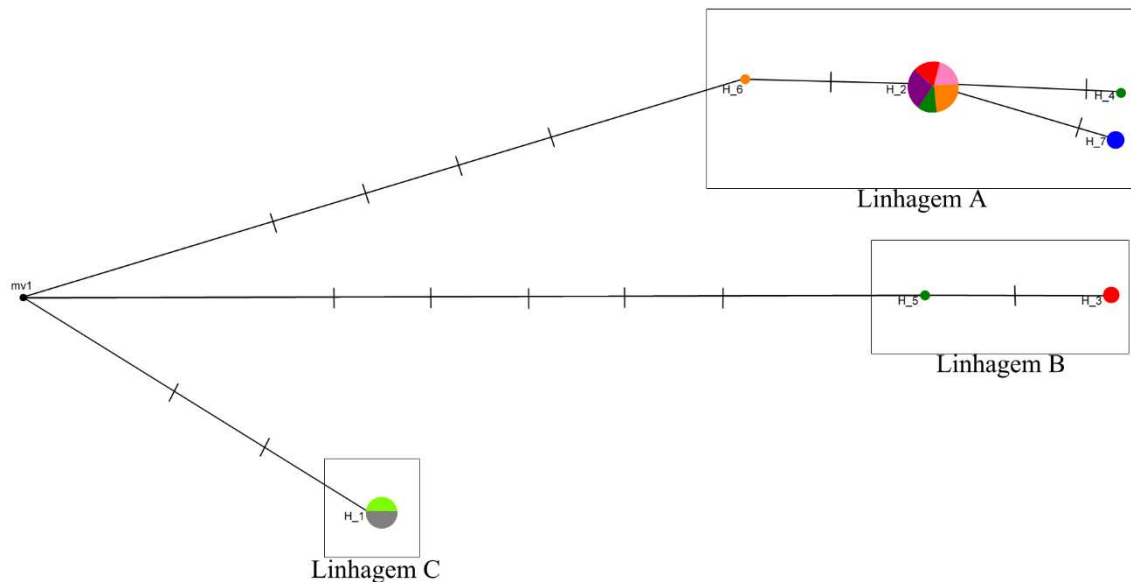


Figura 5 - Rede de Haplótipos gerada pelo software Network a partir das sequências de *ATPase 6/8*. O tamanho dos nós é proporcional à sua frequência. Cada traço representa um passo mutacional ocorrido entre os haplótipos. Cada população é representada por uma cor. Vermelho: Córrego Curral das Éguas; Rosa: Córrego Vereda Grande; Roxo: Rio do Boi; Verde escuro: Córrego Lambari; Laranja: Córrego Tiros; Azul escuro: Córrego Lage; Verde claro: Rio Abaeté; Cinza: Açude; Preto: haplótipos faltantes.

A rede de haplótipos gerada a partir das sequências de *CytB* também demonstrou 3 linhagens derivadas de um haplótipo ancestral/não coletado, porém com composição ligeiramente diferente das linhas da rede de haplótipos de *ATPase 6/8*. 15 haplótipos foram identificados e a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,9115 (Figura 6).

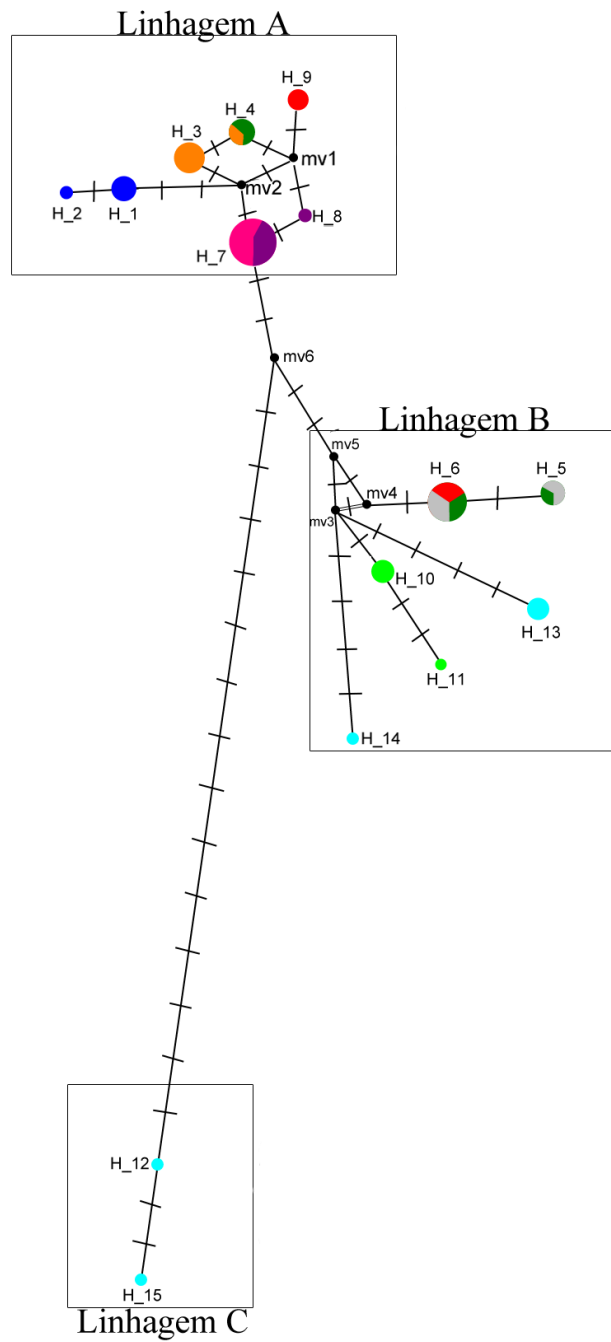


Figura 6 - Rede de Haplótipos gerada pelo software Network a partir das sequências de *CytB*. O tamanho dos nós é proporcional à sua frequência. Cada traço representa um passo mutacional ocorrido entre os haplótipos. Cada população é representada por uma cor. Vermelho: Córrego Curral das Éguas; Rosa: Córrego Vereda Grande; Roxo: Rio do Boi; Verde escuro: Córrego Lambari; Laranja: Córrego Tiros; Azul escuro: Córrego Lage; Verde claro: Rio Abaeté; Cinza: Açude; Azul claro: Ribeirão Bandeirinhas. Preto: haplótipos faltantes.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo apontam para a evidência da existência de mais de uma espécie sob o nome de *Astyanax rivularis*. Embora alguns pares de populações apresentem distâncias genéticas similares às encontradas para espécies do gênero (Deprá *et al.*, 2014, Kavalco *et al.*, 2016), o agrupamento Ribeirão Bandeirinhas “A” apresentou grande divergência das outras populações. Essa diferença supera os 2%, valor considerado como o limiar para genes mitocondriais para determinar a existência de espécies diferentes (Pages e Hughes, 2010; April *et al.*, 2013; Rossini *et al.*, 2016). Os valores de distância genética encontrado para Ribeirão Bandeirinhas “A” são superiores àqueles encontrados na diferenciação entre *Astyanax rivularis* e *Astyanax paranae*, espécies equivalentes de bacias diferentes que fazem parte do complexo *Astyanax scabripinnis* (Rocha *et al.*, in press).

Ao analisar conjuntamente o agrupamento e comprimento dos ramos no dendrograma gerado para a *CytB* (Figura 3), o número de passos mutacionais que separam o haplótipo ancestral da linhagem constituída pelo Ribeirão Bandeirinhas “A” (Figura 6) e a distância genética entre ele e as outras populações (Tabela 3), pode-se inferir que provavelmente trata-se de uma espécie diferente de *Astyanax rivularis*.

Apesar da grande distância genética entre as populações, quando analisada a distância intra-populacional, há baixo nível de diferenciação dentro das populações. Seis das nove populações de *Astyanax rivularis* coletadas não apresentaram variação genética para ambos os genes analisados (Tabela 2). Baixa diversidade genética é um dos fatores que pode afetar a manutenção de populações, haja visto que quanto menor a variabilidade, menor a probabilidade de os organismos poderem responder às modificações ambientais (Carvalho, 1993). Segundo o CBHSF (2016), a Bacia do Rio São Francisco como um todo é constantemente ameaçada por assoreamento dos cursos d’água, introdução de espécies exóticas e diminuição da vazão de água. A região onde a maioria dos pontos de coleta do presente estudo foram realizadas também sofrem impacto devido à agricultura (Godinho e Godinho, 2003).

As redes de haplótipos, apesar de terem conformações diferentes, indicam a ocorrência dos mesmos eventos demográficos atuando na distribuição das bacias nas áreas amostradas. Ambas apontam para a existência de um haplótipo ancestral de onde provavelmente se originaram os haplótipos amostrados, ou seja, de uma população que deu início ao processo de colonização dos rios. Na rede gerada para o gene da *ATPase*

6/8 (figura 5) é possível perceber que a partir do haplótipo ancestral derivam-se 3 linhagens de *A. rivularis*. Córrego Lambari e Curral das Éguas aparecem em duas das linhagens derivadas de mv1. Assim, pode-se inferir que esses córregos foram inicialmente colonizados pelos haplótipos existentes na linhagem A, ocorrendo uma segunda colonização desses cursos d'água por indivíduos da linhagem B. A frequência maior dos haplótipos da linhagem A na rede corrobora essa teoria (Posada e Crandall, 2001). A linhagem derivada C contém apenas indivíduos do Rio Abaeté e Açude. Essa linhagem é ausente na rede gerada a partir do gene *CytB* (figura 6). Nessa rede, observamos que as populações de Abaeté e Açude não formam um agrupamento exclusivo, fazendo parte da linhagem B.

As diferentes taxas de evolução dos genes utilizados podem explicar o resultado encontrado. O gene da *ATPase 6/8* possui uma taxa de mutação um pouco mais alta que o *CytB* (Brown *et al.*, 1979). Dessa forma, em um menor intervalo de tempo pode acumular maior número de mudanças, sendo capaz de separar grupos mais recentes que não podem ser observados em outros genes (Fearnley e Walker, 1992; Page e Hughes, 2010). Mesmo com essas diferenças, entretanto, é possível perceber que a rede gerada para o gene *CytB* conta a mesma história de duas colonizações dos rios na bacia. É necessário notar a presença dos indivíduos que compõe o Ribeirão das Bandeirinhas B na linhagem B, indicando que parte da população do curso d'água pode ter sido estabelecida no segundo evento de dispersão que levou à colonização dos Rios Abaeté, Lambari e Curral das Éguas. A linhagem C, representada pelos indivíduos que compõem o Ribeirão Bandeirinhas A, surgiu a partir do haplótipo ancestral, porém apresenta um maior número de passos mutacionais o separando deste, indicando que a separação/isolamento entre eles deve ter ocorrido há mais tempo do que aquele observado para as outras linhagens (Templeton, 2004). É bastante evidente que há dois eventos colonizadores independentes na formação do pool genético do Ribeirão Bandeirinhas, o que provavelmente deve estar registrado no genoma nuclear e em nível cromossômico. Talvez a introgressão de novos aportes populacionais possa explicar a grande diversidade cromossômica observada em *A. rivularis* (Pazza e Kavalco, 2007).

As análises filogenéticas dos genes mitocondriais *CytB* e *ATPase 6/8*, mostraram uma história evolutiva similar para ambos os genes, apesar de o *CytB* ter sido mais resolutivo (figuras 3 e 4). Em ambos dendrogramas houve a separação de

dois grandes clados. A topologia dos dendrogramas é coerente com a separação observada pelas redes de haplótipos.

No clado A (figuras 3 e 4), podemos perceber o agrupamento de indivíduos do córrego Vereda Grande e Rio do Boi. O córrego é um tributário do Rio do Boi, com pontos de coleta próximos. A distância genética entre as duas populações  $d = 0$  indica livre fluxo gênico entre as mesmas, de forma que não haja isolamento capaz de manter mutações isoladas em uma das populações (Slatkin, 1987; Bradic *et al.*, 2012). O córrego Lambari, afluente do Rio Borrachudo, não possui nenhum contato direto com os rios do Clado A. Entretanto, ele se localiza em uma área próxima de uma série de afluentes que possuem conexão com o Córrego Tiros. Dessa maneira, em momentos de enchente, que são comuns nessa região do Alto São Francisco (Santos *et al.*, 2012), pode ser recorrente o contato entre os afluentes, havendo troca de fauna entre as diferentes populações. Além disso, como observado na rede de haplótipos (figuras 5 e 6), o córrego Lambari compartilha haplótipos com o córrego Tiros e estes estão relacionados com os outros rios que formam o clado. O córrego Lage mostrou-se como uma das populações mais isoladas dentro da análise. É a única população em que se observou apenas um haplogrupo exclusivo na rede de haplótipos, sem compartilhamento com outras populações. Também apresentou estruturação em ambos os dendrogramas (figuras 3 e 4) e possui distância genética  $d > 0$  com todas as outras populações. É uma população que possui uma grande variedade cariotípica em simpatria, possuindo número cromossômico que varia de  $2N=46$  a  $2N=50$ , sendo que alguns indivíduos apresentam cromossomos B (Rodrigues-Oliveira *et al.*, em preparação). Tamanha variação pode impedir que haja fluxo gênico entre a população do Córrego Lage e rios mais próximos, pois pode impedir a formação de zigotos viáveis entre as populações devido a diferenças no pareamento dos cromossomos (Rieseberg, 2001; Noor *et al.*, 2001).

O agrupamento formado pelos indivíduos do córrego Curral das Éguas no clado A teve um bom nível de robustez em ambos os dendrogramas (figuras 3 e 4), demonstrando que, apesar de relacionado com as populações do Clado A, possui algum grau de isolamento, que pode ser refletido no fato de o ponto de coleta não possuir nenhuma conexão direta com as outras populações.

Indivíduos do Açude e Rio Abaeté ficaram agrupados no clado B, havendo, porém, uma maior estruturação do Rio Abaeté no dendrograma do gene *CytB*. Como

o Açude é localizado próximo ao Rio Abaeté e a água deste é usada para seu enchimento, isso poderia explicar o agrupamento destas populações, além da ausência de distância genética entre elas, haja visto que os indivíduos do açude inicialmente pertenceriam ao Rio Abaeté. Ainda no clado A há a presença de indivíduos do córrego Lambari e Curral das Éguas. A presença de indivíduos dessas populações nesse clado, apesar da grande distância que separa os pontos de coleta e a ausência de conexões entre os rios, pode ser explicado pelo evento de colonização secundária que ocorreu em alguns rios. Conforme evidenciado pela rede de haplótipos de *CytB*, indivíduos dessas populações receberam uma segunda leva de colonizadores que possuíam proximidade com indivíduos do Rio Abaeté.

O padrão de duas ondas de colonização em rios é frequentemente visto em peixes. A colonização de cavernas por *Astyanax mexicanus* ocorreu com dois grandes aportes de indivíduos das populações de superfície (Gross, 2012). O gênero *Rhamdia* colonizou a mesoamérica em duas diferentes ondas (Perdices *et al.*, 2002), e teoriza-se que o grupo “peixes” como um todo também tenha colonizado a mesoamérica em dois grandes eventos colonizatórios (Rosen, 1978; Bussing, 1985).

Os indivíduos do Ribeirão Bandeirinhas “A”, conforme mostrado na rede de haplótipos, descenderam do haplótipo ancestral da espécie na bacia. Dessa forma, num evento de colonização que pode ou não ter sido juntamente com o responsável pela colonização da linhagem A, a população colonizou as águas do hoje Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC). A grande variedade de ambientes existentes devido à presença de dois biomas nessa região, Mata Atlântica e Cerrado, além do maior nível de isolamento em relação às outras populações, devido distância geográfica e ausência de conexões entre os rios, pode levar a um maior acúmulo de mutações que podem ser responsáveis pela formação de espécies diferentes, muitas vezes sem grandes alterações morfológicas, situação bastante usual em complexos de espécies (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Bickford *et al.*, 2007; Pazza *et al.*, 2008).

A situação dos indivíduos do Ribeirão Bandeirinhas “B” é similar, como evidenciado pela linhagem na rede de haplótipos. Entretanto, estes indivíduos apresentam maior similaridade com os indivíduos que colonizaram os rios na segunda dispersão. Dessa forma, nos rios do PNSC provavelmente também ocorreu uma segunda colonização, entretanto esta não foi realizada por indivíduos descendentes diretamente do haplótipo ancestral. De tal maneira, devido ao menor tempo de

diferenciação em relação às outras populações, esta linhagem ainda não acumulou mutações suficientes para haver uma grande divergência entre ele e as outras populações da distribuição do Alto rio São Francisco.

Uma vez que o gênero *Astyanax* é sabidamente portador de grande diversidade cariotípica, e que há diferentes formas cromossômicas ao longo da bacia do rio São Francisco, é recomendável investigar se as populações Bandeirinhas A e B possuem os mesmos marcadores cariotípicos e se há diferenciação morfológica dentro da população e entre as populações da drenagem. Abordagens com múltiplas ferramentas (Kavalco *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Rocha-Reis *et al.*, 2018) podem contar mais sobre a história evolutiva do grupo e indicar processos incipientes de especiação, tão comuns em *Astyanax*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores moleculares utilizados mostraram-se eficientes em resgatar informações sobre diversidade genética, filogeografia e estruturação das populações analisadas. De forma geral, observa-se uma baixa variabilidade genética dentro das populações, embora possuam grau de diferenciação entre elas.

A distribuição geográfica dos pontos de coleta não é congruente com os resultados encontrados neste trabalho. Dessa forma, a vicariância parece não ter um forte papel na evolução das populações amostradas, embora o isolamento possa ser responsável pela manutenção de algumas populações como observadas atualmente.

Os resultados encontrados tornam possível afirmar que pelo menos alguns indivíduos coletados no Ribeirão Bandeirinhas provavelmente tratam-se de uma unidade taxonômica distinta da espécie *Astyanax rivularis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Veríssimo, S., & Okada, E. K. (2004). Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish biology and Fisheries*, 14(1), 11–19.
- 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. doi:10.1111/mec.12116
- Ashikaga, F. Y., Orsi, M. L., Oliveira, C., Senhorini, J. A., & Foresti, F. (2015). The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 98(7), 1845–1855.
- Avice, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7(4), 371–379.
- Bandelt, H. J., Röhl, A., & Forster, P. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Bennemann, S. T., Silva-Souza, A. T., & Rocha, G. R. A. (1995). Composición ictiofaunística en cinco localidades de la cuenca del río Tibagi, PR-Brasil. *Interciencia*, 20(1), 7–13.
- Bertaco, V. A., & Lucena, C. A. S. de. (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. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-62252006000100004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252006000100004&nrm=iso)
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. doi:doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004
- Billington, N., & Hebert, P. D. N. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(S1), 80–94.
- Borba, R., Zawadzki, C., Oliveira, C., Perdices, A., Parise-Maltempi, P., & Alves, A. (2013). Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology* (Vol. 11). doi:10.1590/S1679-62252013000100013
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S., & Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 9. doi:10.1186/1471-2148-12-9
- Brown, W. M., George Jr, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1967–1971. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/109836>

- Bussing, W. A. (1985). Patterns of distribution of the Central American ichthyofauna. In *The great American biotic interchange* (pp. 453–473). Springer.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43(sA), 53–73. doi:10.1111/j.1095-8649.1993.tb01179.x
- Casatti, L., & Castro, R. (2006). Testing the ecomorphological hypothesis in a headwater riffles fish assemblage of the Rio São Francisco, southeastern Brazil. *Neotropical ichthyology*, 4(2), 203–214.
- Castresana, J. (2001). Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 465–471.
- Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O. A., Santos, M. H., Nogaroto, V., et al. (2015). Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 25(1), 231–244. doi:10.1007/s11160-014-9377-3
- CBHSF – Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. (2016). *Plano de recursos hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco 2016-2025*
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., & Volckaert, F. A. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1–4), 1–29.
- Codevasf - Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (2010). *Alto São Francisco*. Disponível em <<http://www2.codevasf.gov.br/osvales/vale-do-sao-francisco/recus/>>. Acessado em 01 fevereiro 2019
- Deprá, I., N Gomes, V., Deprá, G., J Oliveira, I., M A P Prioli, S., & Prioli, A. J. (2014). Molecular study of *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) as a probable species complex. *Genetics and molecular research: GMR* (Vol. 13). doi:10.4238/2014.August.7.16
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Loughheed, S. C. (2007). Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leafhopper frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 247. doi:10.1186/1471-2148-7-247
- Eschmeyer WN, Fong JD. (2019) *Catalog of Fishes*. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.aspx>> Acesso em: 15 de Janeiro 2019.
- Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (1992). Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1140(2), 105–134. doi:10.1016/0005-2728(92)90001-I
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.

- Garutti, V., & Langeani, F. (2009). Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(3), 371–376.
- Godinho, A., & Godinho, H. (2003). *Breve visão do São Francisco. Águas, Peixes E Pescadores Do São Francisco Das Minas Gerais*.
- Gross, J. B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 105.
- Habib, M., Lakra, W. S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A. S., Singh, A., et al. (2011). Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Molecular Biology Reports*, 38(2), 841–846. doi:10.1007/s11033-010-0175-2
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160–174. doi:10.1007/BF02101694
- Hoang, D. T., Vinh, L. S., Chernomor, O., Minh, B. Q., & von Haeseler, A. (2017). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. doi:10.1093/molbev/msx281
- ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Biodiversidade. (2009). Parque Nacional da Serra do Cipó – Guia de visitantes. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradocipo/guia-do-visitante.html>>. Acessado em 28 de Janeiro de 2018
- Junk, W. J., Bayley, P. B., & Sparks, R. E. (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences*, 106(1), 110–127.
- Kavalco, K. F., Brandão, K. de O., Pazza, R., & Almeida-Toledo, L. F. de. (2009). *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? *Genetics and Molecular Biology*, 32(3), 477–483.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandao, K. D. O., Garcia, C., & Almeida-Toledo, L. F. de. (2011). Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(2), 108–119.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandão, K. de 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. doi:10.1089/zeb.2016.1272
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695–1701.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773.

- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lucena, C. A. S. de, & Soares, H. G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the Rio La Plata and Rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072(1), 101–125.
- Lyon, J., Stuart, I., Ramsey, D., & O’Mahony, J. (2010). The effect of water level on lateral movements of fish between river and off-channel habitats and implications for management. *Marine and Freshwater Research*, 61(3), 271–278.
- Maistro, E. L., Oliveira, C., & Foresti, F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23, 365–369.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572000000200021&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572000000200021&nrm=iso)
- Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces ; Characidae) : a “species complex.” *Brazilian Journal of Genetics*, 14, 331–357.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. (2004). Programa de revitalização da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. *Caderno 3 - Diagnóstica da bacia*
- Nelson, J., Grande, T., & Wilson, M. (2016). *Fishes of the World, Fifth Edition*. *Fishes of the World: Fifth Edition*. doi:10.1002/9781119174844
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.  
doi:10.1093/molbev/msu300
- Noor, M. A. F., Grams, K. L., Bertucci, L. A., & Reiland, J. (2001). Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12084–12088. doi:10.1073/pnas.221274498
- Oliveira, C. A. M., Pavanelli, C., & Bertaco, V. (2017). A new species of *Astyanax* Baird & Girard (Characiformes: Characidae) from the upper rio Araguaia, Central Brazil. *Zootaxa* (Vol. 4320). doi:10.11646/zootaxa.4320.1.10
- Orsi, M. L., Carvalho, E. D., & Foresti, F. (2004). Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 207–218.
- Page, T. J., & Hughes, J. M. (2010). Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 77(9), 2093–2122. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02821.x
- Paiva, E., Jacobina, U. P., & Dergam, J. A. (2011). Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)(Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9(2), 325–333.
- Pazza, R., & Kavalco, K. F. (2007). Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *NUCLEUS-CALCUTTA*-, 50(3), 523.

- Pazza, R., Kavalco, S. A. F., Penteadó, P. R., Kavalco, K. F., & DeAlmeida-Toledo, L. F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, 72(8), 2002–2010. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x
- Pazza, R., Dergam, J. A., & Kavalco, K. F. (2018). Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei: Characiformes: Characidae): insights from molecular data. *Frontiers in genetics*, 9, 131.
- 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00224-5
- Pompeu, P. dos S., & Godinho, H. P. (2006). Effects of extended absence of flooding on the fish assemblages of three floodplain lagoons in the middle São Francisco River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 4 (4), 427-433.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in ecology & evolution*, 16(1), 37–45.
- Rambaut, A. (2009). FigTree. Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <http://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 351–358. doi:10.1016/S0169-5347(01)02187-5
- Rocha, R. R., Alves, R. M., Pazza, R. and Kavalco, K. F. (in press). Morphological and genetic structure of two equivalent *Astyanax* species (Characiformes: Characidae) in the region of Paranaíba Arc. *The Scientific World Journal*.
- Rocha-Reis, D. A., de Oliveira Brandão, K., de Almeida-Toledo, L. F., Pazza, R., & Kavalco, K. F. (2018). The Persevering Cytotaxonomy: Discovery of a Unique XX/XY Sex Chromosome System in Catfishes Suggests the Existence of a New, Endemic and Rare Species. *Cytogenetic and genome research*, 156(1), 45–55.
- Rodrigues-Oliveira, I. H., Pazza, R. and Kavalco, K. F. Role of vicariance in the maintenance of syntopic evolutionary units with different diploid numbers. *Manuscrito em preparação*.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539–542.
- Rosen, D. E. (1978). Vicariant Patterns and Historical Explanation in Biogeography. *Systematic Biology*, 27(2), 159–188. <http://dx.doi.org/10.2307/2412970>

- Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., de Melo, F. A. G., de Araújo Bertaco, V., de Astarloa, J. M. D., Rosso, J. J., et al. (2016). Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PloS one*, *11*(12), e0167203.
- Saccone, C. (1994). The evolution of mitochondrial DNA. *Current opinion in genetics & development*, *4*(6), 875–881.
- Santos, H., Pompeu, P., & Okuma, D. (2012). Changes in the flood regime of São Francisco River (Brazil) from 1940 to 2006. *Regional Environmental Change - REG ENVIRON CHANG* (Vol. 12). doi:10.1007/s10113-011-0240-y
- Shibatta, O., Orsi, M., Bennemann, S., & Silva-Souza, Â. (2002). Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi.
- Silva, D., Utsunomia, R., Ruiz-Ruano, F., Oliveira, C., & Foresti, F. (2016). The complete mitochondrial genome sequence of *Astyanax paranae* (Teleostei: Characiformes). *Mitochondrial DNA Part B: Resources* (Vol. 1). doi:10.1080/23802359.2016.1222251
- Sivasundar, A., Bermingham, E., & Ortí, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, *10*(2), 407–417. doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01194.x
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, *236*(4803), 787–792. doi:10.1126/science.3576198
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(4), 978–989.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Templeton, A. R. (2004). Using Haplotype Trees for Phylogeographic and Species Inference in Fish Populations. *Environmental Biology of Fishes*, *69*(1), 7–20. doi:10.1023/B:EBFI.0000022870.76912.0c
- Uieda, V. S., & Motta, R. L. (2007). Trophic organization and food web structure of southeastern Brazilian streams: a review. *Acta Limnologica Brasiliensia*, *19*(1), 15–30.
- Zanata, A., Burger, R., & Camelier, P. (2018). Two new species of *Astyanax* Baird & Girard (Characiformes: Characidae) from the upper rio Paraguaçu basin, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. *Zootaxa* (Vol. 4438). doi:10.11646/zootaxa.4438.3.3