

MARCOS AURÉLIO DA SILVA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DO GÊNERO *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) DE BACIAS ADJACENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

S586d
2018
Silva, Marcos Aurélio da, 1992-
Diversidade morfológica do gênero *Astyanax* Baird &
Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) de bacias adjacentes /
Marcos Aurélio da Silva. – Rio Paranaíba, MG, 2018.
vi, 28 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Rubens Pazza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 10-18.

1. Peixes. 2. Peixes - Populações. 3. Peixes - Morfologia. 4.
Astyanax. 5. Peixes - Anatomia . I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597

MARCOS AURÉLIO DA SILVA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DO GÊNERO *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) DE BACIAS ADJACENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 26 de abril de 2018



Pedro Seyferth Ribeiro Romano



Carlos Alexandre Fernandes



Rúbens Pazza
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Orlando e Maria de Fátima, que desde minha tenra idade me incentivaram na educação e busca da leitura, bem como seguiram me apoiando em todas as minhas empreitadas escolares e acadêmicas, fica meu primeiro e incondicional agradecimento.

Aos meus professores favoritos e orientadores, Rubens e Karine, que me apresentaram à evolução e genética de peixes, incentivando o trabalho, corrigindo e dando apoio nos momentos necessários.

À toda a equipe do LaGEEvo, amigos com quem convivi durante anos produtivos, em especial Snaydia, Renan, Rosana, Dinaíza, Pierre, Francisco, Matheus, Iuri, Igor, Winston, Roberta e todos os demais.

Ao professor Pedro Romano, que me apresentou ao empolgante campo da morfometria geométrica.

A Giselle Perazzo, que contribuiu muito com diversas sugestões, me ensinando os princípios de alguns softwares usados nas análises.

Aos colegas e amigos do BEAGLE: Cynthia, Christian, Frederico, Cássia e ao professor Jorge Dergam.

Agradeço também à turma de bons amigos que conheci em Viçosa: Michel, José, Bárbara, Ricardo, Ivan, Micaele, Anny, Ronaldo, Michele, Pedro, Mauro e Natália.

À República dos Aflitos, em especial Gabriel e Adriano, com quem morei durante um ótimo período em Viçosa.

Obrigado

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ARTIGO	vi
Diversidade morfológica do gênero <i>Astyanax</i> Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) de bacias adjacentes	
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	3
RESULTADOS	4
DISCUSSÃO/CONCLUSÃO	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
TABELA	19
FIGURAS	20
MATERIAL SUPLEMENTAR	23
ANEXOS	25

RESUMO

SILVA, Marcos Aurélio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Diversidade morfológica do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) de bacias adjacentes.** Orientador: Rubens Pazza. Coorientadores: Karine Frehner Kavalco e Jorge Abdala Dergam dos Santos.

A região neotropical é altamente diversa em peixes teleósteos de água doce e se estende por vastas regiões da América do Sul. O gênero *Astyanax* comporta peixes de pequeno porte encontrados nos afluentes e calhas das grandes bacias brasileiras, como dos rios Paraná e São Francisco. Esse grupo tem sido ostensivamente estudado do ponto de vista cromossômico e molecular, mas ainda está envolto em problemas de localização filogenética, justificando seu posicionamento *incertae sedis*, ao mesmo tempo em que tem uma ampla diversidade de formatos e habitats. Nosso estudo contou com as análises das variações de configuração corporal em sete espécies do gênero *Astyanax*, nos complexos *bimaculatus*, *fasciatus* e *scabripinnis* com o uso de morfometria geométrica. Obtivemos imagens de 167 indivíduos, delimitamos marcos anatômicos bidimensionais que então submetemos à análise generalizada de procrustes, regressão multivariada e posterior ordenação por PCA e CVA, com o n sendo estatisticamente suportado. Os resultados mostraram variação conspícua entre dois grandes grupos, relacionados principalmente às variações de altura na configuração corporal, suportando a existência de diferentes unidades evolutivamente significativas moldadas morfológicamente pela pressão do meio e com o que pode ser especiação incipiente.

ABSTRACT

SILVA, Marcos Aurélio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018. **Morphological diversity of the *Astyanax* genus, Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) of adjacent basins.** Advisor: Rubens Pazza. Co-advisors: Karine Frehner Kavalco and Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The Neotropical region is highly diverse in freshwater teleost fishes and extends through vast regions of South America. The *Astyanax* genus is formed by small fish found in the tributaries and main rivers of the great Brazilian basins, such as the Paraná and São Francisco Rivers. This group has been well studied from a chromosomal and molecular point of view, but is still involved in problems of phylogenetic location, justifying its *incertae sedis* position, while having a wide diversity of forms and habitats. Our study counted on the analysis of body shape variations in seven species of the *Astyanax* genus, in the *bimaculatus*, *fasciatus* and *scabripinnis* complexes with the use of geometric morphometrics. We obtained images of 167 individuals, delimited two-dimensional landmarks that we then submitted to the generalized analysis of procrustes (GPA), multivariate regression and, later, ordination by PCA and CVA, with the sample being statistically supported. The results showed conspicuous variation between two large groups, mainly related to height variations in the body shape, supporting the existence of different evolutionarily significant units morphologically shaped by the pressure of the environment and with what may be incipient speciation.

ARTIGO

Diversidade morfológica do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) de bacias adjacentes

Silva. M. A., Perazzo. G. X., Kavalco. K. F., Pazzo. R. Diversidade morfológica do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) de bacias adjacentes. – *Acta Zoologica* (Stockholm).

Palavras-Chave: evolução morfológica, complexos de espécies, morfometria geométrica, shape, *incertae sedis*

Título condensado: Diversidade morfológica em *Astyanax*

Rubens Pazzo. Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva, Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, Rodovia BR354, km 310 (a 1300m), ZIP Code 38810-000, PO Box 22, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: (rpazzo@ufv.br)

Introdução

A ictiofauna neotropical de água doce é notavelmente rica e diversa (Reis *et al.*, 2003), com a maior parte das espécies pertencente às ordens Siluriformes e Characiformes. A região ictiofaunística Neotropical se estende por mais de 17000 km² e, apesar de toda essa excepcional riqueza, ela é relativamente pobre em altos níveis taxonômicos, com apenas 17 ordens, comparadas com as 26 ordens da bacia do Mississipi e bacias circundantes (Albert *et al.*, 2011).

O rio Paraná é o segundo rio mais longo da América do Sul (4, 695 km) e o décimo no mundo em descarga de água e o quarto em área de drenagem (Agostinho *et al.*, 1995) cobrindo aproximadamente 891,000 km² de Floresta Tropical Atlântica e Cerrado na região mais urbanizada e explorada do Brasil (Pereira *et al.* 2013). Comparado com outras grandes bacias brasileiras, o alto rio Paraná é considerado um dos mais intensamente estudados (Agostinho *et al.*, 2007) e segundo Castro *et al.* (2004) [trocar por Langeani] possuía por volta de 270 espécies descritas. A bacia do rio São Francisco, o quarto maior rio do Brasil, possui pelo menos 205 espécies de peixes (Alves *et al.*, 2007).

A ordem Characiformes inclui o gênero *Astyanax*, reconhecido hoje como *Incertae sedis* dentro da família (Lima *et al.*, 2003) devido à sua origem polifilética (Weitzman e Malabarba, 1998), e atualmente é composto de 210 espécies válidas (Fishbase). Distribui-se ao longo do sul dos Estados Unidos até a Argentina Central (Ornelas-Garcia *et al.*, 2008) e a sistemática desse grupo continua pobre e confusa (Castro *et al.*, 2015), entretanto, conhecer a taxonomia dos peixes é uma condição básica para a conservação das espécies (dos Santos *et al.*, 2016).

“*Astyanax bimaculatus*” é considerado um complexo de espécies. Compreendendo pelo menos 20, todas elas caracterizadas por um ponto negro oval e horizontal na região humeral, duas barras marrons verticais na região humeral, e um ponto negro no pedúnculo caudal estendendo-se acima da extremidade dos raios caudais medianos (Garutti e Britski, 2000). Dentro do complexo são encontrados, respectivamente, na bacia do alto Paraná e São Francisco *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) e *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), espécies que pouco diferem morfologicamente, sempre levantando questões acerca da validade das mesmas (Peres *et al.*, 2012). Lucena e Soares (2016) em revisão do complexo assumiram com base em dados merísticos que *Astyanax altiparanae*, *Astyanax asuncionensis* e *Astyanax jacuhiensis* são sinônimos juniores de *Astyanax lacustris*.

Astyanax scabripinnis e *Astyanax fasciatus* são entidades taxonômicas de ictiofauna neotropical de água doce, e suas características morfológicas e cariotípicas sugerem que elas também são complexos de espécies (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Centofante *et al.*, 2003; Pazza *et al.*, 2006; Abel *et al.*, 2006). Entretanto, Lima *et al.* (2003) elevaram sem profundas análises *Astyanax paranae* e *Astyanax rivularis*, antes subespécies de *Astyanax scabripinnis*, à unidades taxonômicas independentes.

A morfometria geométrica é uma abordagem desenvolvida que analisa informação na covariação espacial entre marcos anatômicos (Rohlf e Marcus, 1993). Como a morfometria geométrica se apoia em variáveis de configuração comparáveis estatisticamente e multivariadas, é possível reconstruir um grupo consenso de configuração e uma configuração hipotética do ancestral comum (Clabaut *et al.*, 2006). O *shape* retém as variáveis de forma e configuração, o que exclui a variável tamanho do espaço tangente, tratando-se de uma abordagem adequada para compreender as diversas causas de variação morfológica e transformação fenotípica (Zelditch *et al.*, 2012). *Shape*

é então definido por toda a informação geométrica acerca da configuração de marcos anatômicos invariável no tamanho, posição e orientação (Dryden & Mardia, 1998).

Neste trabalho, com o uso dos dados morfométricos, estudamos sete espécies de diferentes bacias brasileiras e verificar se sua variação no shape independe ou não da pressão do meio. Foi possível avaliar a variação de *shape* das diferentes amostras nos afluentes da bacia do alto rio São Francisco e da bacia do alto rio Paraná determinando os *shapes* médios interespecíficos e interpopulacionais afim de se visualizar estruturação e proximidade daquelas que podem ser diferentes unidades evolutivamente significativas.

Materiais e Métodos

Analisamos os indivíduos a partir do material disponível e identificado segundo as chaves de identificação vigentes (Britski *et al.*, 1986; Da Graça e Pavanelli, 2007) tombado na coleção zoológica do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da UFV CRP, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil; proveniente de pontos diversos nas bacias dos rios Paraná e alto São Francisco (Fig. 1) e que possuem menos de 10 anos. Os corpos d'água que serviram de pontos de amostragem variavam em relação ao fluxo da correnteza: ambientes lóticos e lênticos (rios caudalosos, rios com forte corrente e represas).

Para as análises de morfometria geométrica, portanto, obtivemos fotografias dos espécimes (N=167) de 17 diferentes pontos de amostragem, compostas de aproximadamente 10 indivíduos cada (Tab. 1) utilizando máquina fotográfica Sony Cybershot com tripé acoplado em zoom de 4x. Cada espécime foi fotografado pela

mesma pessoa, incluídos em um sistema de coordenadas X/Y, usando o software TpsDig v.1.4 (Rohlf, 2003) com delimitação de 14 marcos anatômicos (*landmarks*) na face esquerda do corpo (Fig. 2a e Fig. 3a) e fator de escala calibrado em 1cm e a matriz gerada foi utilizada nas análises posteriores.

As matrizes de *shape* foram obtidas seguindo uma série de procedimentos: análise generalizada de procrustes (GPA; Rohlf e Slice, 1990), regressão multivariada das coordenadas de procrustes vs. tamanho do centroide com o objetivo de tirar o efeito da alometria utilizando o programa MorphoJ 1.06 (Klinberg, 2011), extração da matriz de covariação e análise dos componentes principais (PCA) dos resíduos de procrustes. Para avaliar a variação no formato entre os grupos, portanto, procedemos com a análise de variação canônica (CVA), que é uma análise de ordenação adequada para capturar a variação multidimensional e discriminar grupos pré-definidos (Zelditch *et al.*, 2004) também no programa MorphoJ 1.06. Na PCA foram utilizados classificadores taxonômicos e ecológicos para visualizar a distribuição dos scores no morfoespaço: espécies, complexos e ambientes. O teste de normalidade Shapiro-Wilkins e o teste de Levene, para verificação de homocedasticidade das amostras, foram feitos através do programa PAST 3 (Hammer & Harper, 2001).

Resultados

O teste de normalidade Shapiro-Wilkins provou a homocedasticidade das amostras e sua distribuição normal com $p > 0.9$. A análise de componentes principais (Fig. 2b) revelou certa ordenação morfoespacial entre as unidades *A. rivularis/A. paranae* com as dos complexos *bimaculatus* e *fasciatus* (ver Material Complementar) em relação aos eixos

PC1, responsável por 43,9% da variação, e PC2, responsável por 11,4% da variação. *A. altiparanae* se sobrepôs com *A. lacustris* (também do complexo *bimaculatus*) *A. asuncionensis* e *A. abramis*, bem como com *A. fasciatus*. Posicionados no outro extremo do morfoespaço, em sobreposição, estão *A. paranae* e *A. rivularis*.

A análise de variáveis canônicas (Fig. 3b) por sua vez demonstra essa estruturação com grupos discriminantes e as variáveis envolvidas no dobramento da grade de deformação, onde o complexo *bimaculatus* se diferencia nitidamente de *A. paranae* e *A. rivularis*, ao longo do eixo da CV1, responsável por 59,9% da variação, com ausência de sobreposição entre as duas espécies representantes do antigo complexo *scabripinnis*: *A. paranae* e *A. rivularis* (esse que se distancia muito de qualquer uma das outras espécies no espaço tangente). *Astyanax fasciatus* se encontra entre *A. paranae* e *A. rivularis* ao longo da CV2 e na mesma posição ao longo da CV1. *Astyanax asuncionensis* permanece separado no morfoespaço das demais espécies do complexo *bimaculatus* sobrepondo-se a *Astyanax abramis*. No nível intraespecífico não houve separação visível entre as amostras.

Discussão/Conclusão

Os mecanismos de evolução alopátrica e simpátrica podem levar ao surgimento de homoplasias, com convergência e paralelismo sendo exemplos notáveis e até mesmo confluentes (ver: Ridley, 2004; Arendt e Reznick, 2008; Muschick, 2012). Os resultados desse trabalho indicam paralelismo incipiente dentro dos complexos *bimaculatus* e *scabripinnis*, sem ligação com a bacia propriamente dita, mas com as características da coluna d'água de cada ponto de ocorrência. É possível que a pressão seletiva do meio

esteja moldando o *shape* dessas populações, já que a forma do corpo dos peixes pode ser interpretada como resultado de adaptações evolutivas às pressões ambientais (Breda *et al.*, 2005), separando os dois grandes blocos de acordo com seguintes configurações: corpo lateralmente comprimido e ovalado (*abramis*, *altiparanae*, *asuncionensis* e *lacustris*) e corpo fusiforme (*paranae* e *rivularis*), que permitem a esses grupos a sobrevivência e exploração dos nichos onde estão presentes. Hanish *et al.* (2014) demonstraram, com estudos merísticos e de índices de compressão corporal, a existência de padrões de diversificação em *A. altiparanae* de acordo com a velocidade de corrente a interferência antrópica nos leitos de riachos, corroborando o caráter seletivo sobre as populações de caracídeos e sua ecomorfologia. Em adição, Desordi *et al.* (2011) também por meio de análises merísticas em *A. asuncionensis* e *A. lacustris* defenderam as hipóteses de manutenção do fenótipo ancestral em *Astyanax* e a existência de caracteres homoplásicos indicando a ocorrência de paralelismo.

As espécies que compõe o complexo *bimaculatus* tiveram sua ocorrência restrita a leitos de riachos e rios caudalosos com baixo fluxo, assim como *A. fasciatus* nas duas bacias. Este, porém, também se distribui em cabeceiras de águas em forte corrente, representadas aqui pelo córrego Olhos d'Água. Vale notar que *A. fasciatus* permanece oscilando entre os dois maiores grupos identificados (Fig. 3) e quando há separação se estrutura próximo aos representantes do complexo *scabripinnis* (Fig. 4).

A pressão seletiva do meio no *shape* pode explicar a diferença entre os dois grandes grupos observados, mas não o é em níveis populacionais e de pequenos grupos, no caso dos complexos *bimaculatus* e *fasciatus*, embora diferenças cromossômicas e moleculares sejam detectadas (Fernandes *et al.*, 2014; Piscor *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016; Kavalco *et al.*, 2016;). *A. fasciatus* é um complexo puramente cromossômico, considerado assim devido à variação em simpatria do n° diploide, (Artoni *et al.*, 2006)

embora apresente grande plasticidade fenotípica (Pazza *et al.*, 2015). De acordo com a análise de variáveis canônicas, as populações desse grupo se aproximam muito de *A. paranae* e *A. rivularis*, se distanciando dos representantes do complexo *bimaculatus* em razão do *shape* e corroborando a proximidade molecular e cromossômica encontrada por Pazza *et al.* (2018) onde, analisando o gene *ATPase 8*, os autores obtiveram por análise de máxima verossimilhança um clado inteiramente distinto com as três espécies juntamente com *Astyanax bockmanni* e *Astyanax bifasciatus*. Podemos, então, estar diante de casos de especiação incipiente, em que unidades levemente distintas são detectadas, mas ainda não totalmente separadas; em toda a instância, a diversidade morfológica é suportada.

A morfometria geométrica, desde sua introdução ao final dos anos 1980, foi utilizada nos mais diversos tipos de estudos biológicos: anatômicos, ontogenéticos, ecológicos, filogenéticos e, claro, taxonômicos. Na resolução de problemas taxonômicos diretamente relacionados à identificação e separação de espécies, a metodologia levou a resultados promissores na investigação de complexos de espécies em insetos himenópteros (Baylac *et al.*, 2003), gêneros de mamíferos (Fadda e Corti, 2001; Evin *et al.*, 2008) e assembleias de peixes (Douglas *et al.*, 2001; Farré *et al.*, 2013; Pérez-Quiñónez *et al.*, 2016).

Os resultados inicialmente corroboram a diferença entre *A. paranae* e *A. rivularis*, que também apresentam divergências cromossômicas e moleculares (Maistro *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, Silva *et al.*, 2014), reforçando a hipótese de duas unidades evolutivamente significativas incluídas no complexo *scabripinnis*.

Essas espécies foram elevadas somente por Lima (2003) sem análises taxonômicas aprofundadas. Autores subsequentes continuaram a deixá-las nominalmente no complexo *scabripinnis* (Bertaco e Lucena, 2006; Ingenito e Duboc, 2014). Em seu

trabalho ainda não-publicado, Oliveira (2017) faz uma extensa revisão do complexo e propõe a redescrição e formalização de *A. paranae* e *A. rivularis* com base em caracteres merísticos.

Astyanax abramis e *Astyanax asuncionensis*, por sua vez, formam um grupo distinto em relação aos demais representantes do complexo *bimaculatus*, contrariando a proposição de Lucena *et al.* (2016) de serem exatamente a mesma unidade que *A. altiparanae* e *A. lacustris*. Não obstante, mais estudos integrados de morfologia e genética se mostram necessários; a diversidade desse gênero reflete a natureza complexa da identificação de espécies de caraciformes Neotropicais, devido a plasticidade fenotípica dos caracteres morfológicos tradicionalmente usados para determinação de espécies, resultando em muitos erros de identificação (Rossini *et al.*, 2016).

Os dados gerados são de utilidade para compreender melhor a diversificação fenotípica do grupo e suas posições de classificação, já que propiciaram estruturação suficiente à nível de *shape* para suportar a hipótese de pressão seletiva do meio moldando a configuração corporal, bem como a existência do complexo *bimaculatus* e das demais unidades evolutivamente significativas. Também propiciarão um ponto de partida, junto com outros trabalhos recentes, no aumento do uso de morfometria geométrica bi e tridimensional, de maneira solo ou integrada, no estudo da evolução e morfoecologia das assembleias de peixes neotropicais, especialmente no gênero *Astyanax* e seus complexos de espécies.

Nossos resultados indicam, portanto, que as unidades estão com seus morfotipos sujeitos ao que pode ser um caso de paralelismo dentro dos dois grandes grupos notados, com evolução divergente entre os mesmos havendo diversificação em diferentes ambientes sujeitos à pressão na qual suas configurações corporais estão

atreladas (ver Material Complementar) e com uma unidade, *A. fasciatus*, que parece deter maior plasticidade fenotípica.

Referências Bibliográficas

Abel, L. D. D. S., Mantovani, M., & Moreira-Filho, O. (2006). Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29(3), 448-452.

doi: 10.1590/S1415-47572006000300008

Agostinho, A. A., Vazzoler, A. E. A. D. M., & Thomaz, S. M. (1995). The high river Paraná basin: limnological and ichthyological aspects. In: Tundisi, J. G., Bicudo, C. E. M., & Matsumura-Tundisi, T. (1995). *Limnology in Brazil*. Leiden, Netherlands; Kluwen Academic Publishers.

Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., Petry, A. C., Gomes, L. C., & Júlio Jr, H. F. (2007). Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 10(2), 174-186.

doi: 10.1080/14634980701341719

Albert, J. S., & Reis, R. (Eds.). (2011). *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press.

Alves, C. B. M., Vieira, F., & Pompeu, P. S. (2007). Programa Zoneamento Ecológico-Econômico: Caderno Temático: Biodiversidade. *Brasília: MMA/SEDR/SBF*. p, 110-130.

Almeida-Toledo, L. F., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Bonillo, C., Porto-Foresti, F., & Daniel-Silva, M. F. Z. (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 97(3-4), 229-233.

doi: 10.1159/000066609

Arendt, J., & Reznick, D. (2008). Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation?. *Trends in ecology & evolution*, 23(1), 26-32.

doi: 10.1016/j.tree.2007.09.011

Artoni, R. F., Shibatta, O. A., Gross, M. C., Schneider, C. H., Almeida, M. C., Vicari, M. R., & Bertollo, L. A. C. (2006). *Astyanax aff. Fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, 4(2), 197-202.

doi: 10.1590/S1679-62252006000200005

Baylac, M., Villemant, C., & Simbolotti. (2003). Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 89-98.

doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00221.x

Bertaco, V. A., & de Lucena, C. A. (2006). Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 4(1), 53-60.

doi: 10.1590/S1679-62252006000100004

Breda, L., de Oliveira, E. F., & Goulart, E. (2005). Ecomorfologia de locomoção de peixes com enfoque para espécies neotropicais. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 27(4), 371-381.

doi: 10.4025/actascibiols.v27i4.127

Castro, R., Casatti, L., Santos, H. F., Melo, A. L., Martins, L. S., Ferreira, K. M., & Abreu, T. X. (2004). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 4(1), 01-39.

doi: 10.1590/S1676-06032004000100006

Centofante, L., Bertollo, L. A. C., Justi, Á. J., & Moreira-Filho, O. (2003). Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14(4), 361-368.

Clabaut, C., Bunje, P. M., Salzburger, W., & Meyer, A. (2007). Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the Tanganyikan cichlid fish radiations. *Evolution*, 61(3), 560-578.

doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00045.x

Da Graça, W. J., & Pavanelli, C. S. (2007). *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*.

Da Silva, L. L., Dos Santos, A. R., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2016). Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. *Cytotechnology*, 68(4), 1277-1286.

doi: 10.1007/s10616-015-9888-3

Desordi, R., Reis, D. G. S., Kavalco, K. F., & Pazza, R. (2011). Variabilidade morfológica e estruturação populacional de lambaris do grupo *Astyanax aff. Bimaculatus* (Teleostei, Characiformes). *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 2(1),73-78.

Douglas, M. E., Douglas, M. R., Lynch, J.M., & McElroy, D. M. (2001). Use of Geometrics Morphometrics to Differentiate *Gila* (Cyprinidae) within the Upper Colorado River Basin. *Copeia*, (2), 389-400.

doi: 10.1643/0045-8511(2001)001[0389:UOGMTD]2.0.CO;2

Duílio, M. D. A., Pansonato-Alves, J. C., Utsunomia, R., Araya-Jaime, C., Ruiz-Ruano, F. J., Daniel, S. N., Hashimoto, D. T., Oliveira, C., Camacho, J.P.M., Porto-Foresti, F., & Foresti, F. (2014). Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS One*, 9(4), e94896.

doi: 10.1371/journal.pone.0094896

Eschmeyer, W. N. (2014) *Catalog of fishes*. Updated internet version, 18 June 2014. Catalog databases of CAS cited in FishBase (website).

Evin, A., Baylac, M., Ruedi, M., Mucedda, M., & Pons, J.M. (2008). Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae): a geometric morphometric appraisal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95, 529-538.

doi: 10.1111/j.1095-8312.2008.01076.x

Fadda, C, & Corti M. (2001). Three-dimensional geometric morphometrics of *Arvicanthus*: implications for systematics and taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, (39), 235-245.

doi: 10.1046/j.1439-0469.2001.00169.x

Farré, M., Tuset, V.M., Maynou, F., Recasens, L., & Lombarte, A. (2013). Geometric morphology for measuring the diversity of fish assemblages. *Ecological Indicators*, (29), 159-166.

doi: 10.1016/j.ecolind.2012.12.005

Fernandes, C. A., da Rocha, R. H., Bailly, D., Guterres, Z. D. R., Alves, D. S., & Martins-Santos, I. C. (2014). Cytogenetic and Morphometric Analysis in the Species *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Iguatemi River Basin, Brazil. *Folia biologica*, 62(3), 193-201.

doi: 10.3409/fb62_3.193

Garutti, V. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Brazil. Serie Zool.*, 13, 65-88.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST-Palaeontological statistics.

Hanisch, R., Mise, F., & Pagotto, J. (2014). Variações ecomorfológicas intraespecíficas em *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 de um riacho neotropical. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 9(3), 23-36.

Ingenito, L. F., & Duboc, L. F. (2014). A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguazu basin, southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(2), 281-290.

doi: 10.1590/1982-0224-20130117

Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandão, 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.

doi: 10.1089/zeb.2016.1272

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.

doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x

Lima, F. C. T. (2003). Genera incertae sedis in Characidae. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*, 106-169.

Lucena, C.A.S., & 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*, 1, 101-125.

doi: 10.11646/zootaxa.4072.1.5

Moreira-Filho, O. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a "species complex". *Brazilian Journal of Genetics.*, 14, 331-357.

Muschick, M., Indermaur, A., & Salzburger, W. (2012). Convergent evolution within an adaptive radiation of cichlid fishes. *Current biology*, 22(24), 2362-2368.

doi: 10.1016/j.cub.2012.10.048

Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

Oliveira, C. A. M. (2017) Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* *sensu* Bertaco & Lucena (2006) (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia.

Ornelas-García, C. P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of morphology*, 275(7), 721-731.

doi: 10.1002/jmor.20252

Pazza, R., Argento, R. F. M., Mariano, I. H., & Kavalco, K. F. (2014). Phenotypic plasticity and karyotype conservation in allopatric populations of *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characiformes) at the Upper Paraná river basin. *Acta Zoologica*, (0), 1-5.

doi: 10.1111/azo.12120

Pazza, R., Dergam, A. J., & Kavalco, K. F. (2018). Trends in Karyotype Evolution in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes, Characidae): Insights From Molecular Data. *Frontiers in Genetics*, (9), 1-11.

doi: 10.3389/fgene.2018.00131

Pazza, R., Kavalco, K. F., & Bertollo, L. A. C. (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112(3-4), 313-319.

doi: 10.1159/000089886

Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1), 20.

doi: 10.1186/1471-2156-14-20

Pérez-Quiñónez, I., Quiñónez-Velázquez, C., Vergara-Solana, F. J., & García-Rodríguez, F. J. (2016). Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill, 1861 in the eastern Mexican Pacific. *Journal of applied ichthyology*, 33(1), 84-92.

doi: doi.org/10.1111/jai.13051

Piscor, D., Alves, A. L., & Parise-Maltempa, P. P. (2015). Chromosomal microstructure diversity in three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: comparative analysis of the chromosomal locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish*, 12(1), 81-90.

doi: 10.1089/zeb.2014.1036

Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. 1th edition, Edipucrs; Porto Alegre, Brasil.

Ridley, M. (2004). *Evolution*. 3th edition, Blackwell Science; Oxford, United Kingdom.

Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, 39(1), 40-59.

doi: 10.2307/2992207

Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.

doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J

Rohlf, F. J., & Bookstein, F. L. (2003). Computing the uniform component of shape variation. *Systematic Biology*, 52(1), 66-69.

doi: 10.1080/10635150390132759

Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., de Melo, F. A. G., de Araújo Bertaco, V., de Astarloa, J. M. D., Rosso, J. J., Foresti, F., & Oliveira, C. (2016). Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PloS one*, *11*(12), e0167203.

doi: 10.1371/journal.pone.0167203

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

doi: 10.1590/S1415-47572008000200002

Weitzman, S. H., & Malabarba, L. R. (1998). Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*, 161-170. EDIPUCRS; Porto Alegre, Brasil.

Zelditch, M. L., Lundrigan, B. L., & Garland, T. (2004). Developmental regulation of skull morphology. I. Ontogenetic dynamics of variance. *Evolution & development*, *6*(3), 194-206.

doi: 10.1111/j.1525-142X.2004.04025.x

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press; United Kingdom

Tabela

Espécie	Ponto de amostragem/Bacia	Coordenadas geográficas	N	Fluxo do corpo d'água
<i>Astyanax altiparanae</i>	rio Uberabinha/rio Paraná	18°40'41.2"S 48°30'23.1"W	10	Léntico
	rio Paranaíba p1/rio Paraná	19°10'55.7"S 46°19'57.6"W	9	Léntico
	rio Paranaíba p2/rio Paraná	19°04'29.9"S 46°24'34.0"W	7	Léntico
<i>Astyanax abramis</i>	rio Cuiabá/rio Paraná	15°42'08.2"S 56°06'40.3"W	10	Léntico
<i>Astyanax asuncionensis</i>	represa Jacobina/rio Paraná	16°03'30.7"S 57°42'27.4"W	10	Léntico
	rio Miranda/rio Paraná	21°06'17.4"S 56°13'54.7"W	10	Léntico
<i>Astyanax fasciatus</i>	rio Santa Catarina/rio São Francisco	17°58'34.0"S 46°50'36.6"W	10	Léntico
	rio Paranaíba p1/rio Paraná	19°10'55.7"S 46°19'57.6"W	10	Léntico
	córrego Olhos d'Água/rio Paraná	19°12'51.9"S 46°16'13.4"W	10	Lótico
<i>Astyanax lacustris</i>	rio Abaeté/rio São Francisco	19°12'38.6"S 46°06'34.7"W	11	Léntico
	rio Vereda Grande/rio São Francisco	18°19'16.4"S 45°06'33.4"W	10	Léntico
	córrego Água Grande/rio Paraná	19°09'34.2"S 46°15'09.8"W	10	Lótico
<i>Astyanax paranae</i>	córrego Lava-Pés/rio Paraná	19°11'29.8"S 46°15'26.6"W	10	Lótico
	rio Paranaíba p1/rio Paraná	19°10'55.7"S 46°19'57.6"W	10	Lótico
	rio Borrachudo/rio São Francisco	18°48'42.3"S 45°45'42.9"W	10	Lótico
<i>Astyanax riularis</i>	córrego da Espinha/rio São Francisco	19°02'47.1"S 46°01'13.0"W	10	Lótico
	rio Abaeté/rio São Francisco	18°59'40.7"S 46°02'22.8"W	10	Lótico

n=167

Tabela 1: Relação dos pontos de amostragem, N utilizado e fluxo de água do ambiente.

Figuras

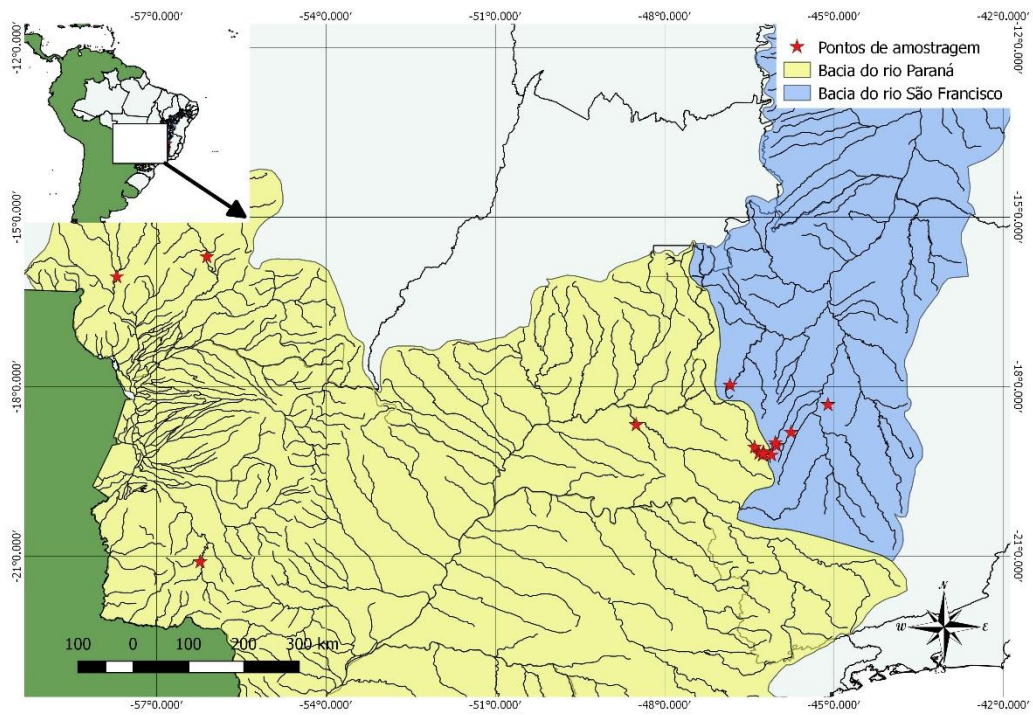


Figura 1: Proveniência dos espécimes nas drenagens das duas bacias no mapa principal. Acima e à esquerda, mapa da América do Sul com destaque para o Brasil indicando o aumento nas regiões central e do sudeste.

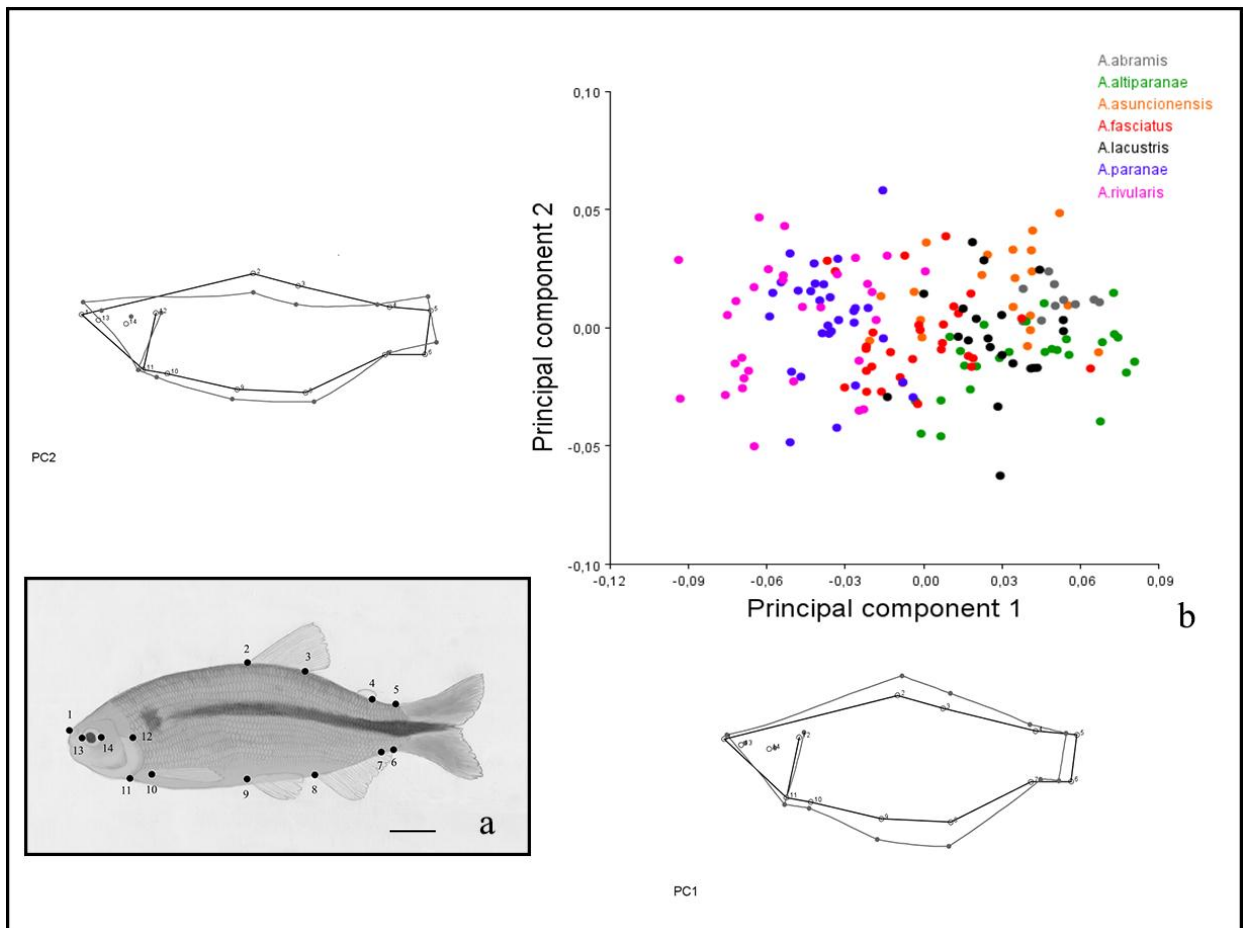


Figura 2: a - Conjunto de marcos anatômicos em exemplar de *A. rivularis*, barra=2cm: 1-ponto distal do rostró; 2-inserção anterior da nadadeira dorsal; 3-inserção posterior da nadadeira dorsal; 4-inserção posterior da nadadeira adiposa; 5-inserção do primeiro raio superior da nadadeira caudal; 6-inserção do primeiro raio inferior 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-extremidade anterior do olho; 14-extremidade posterior do olho; b - PCA indicando ordenação das cinco unidades evolutivas em relação ao *shape* com os *scores* variando em relação as principais componentes 1 e 2 e onde o grande de deformação mais se dobrou por interpolação dos marcos anatômicos homólogos.

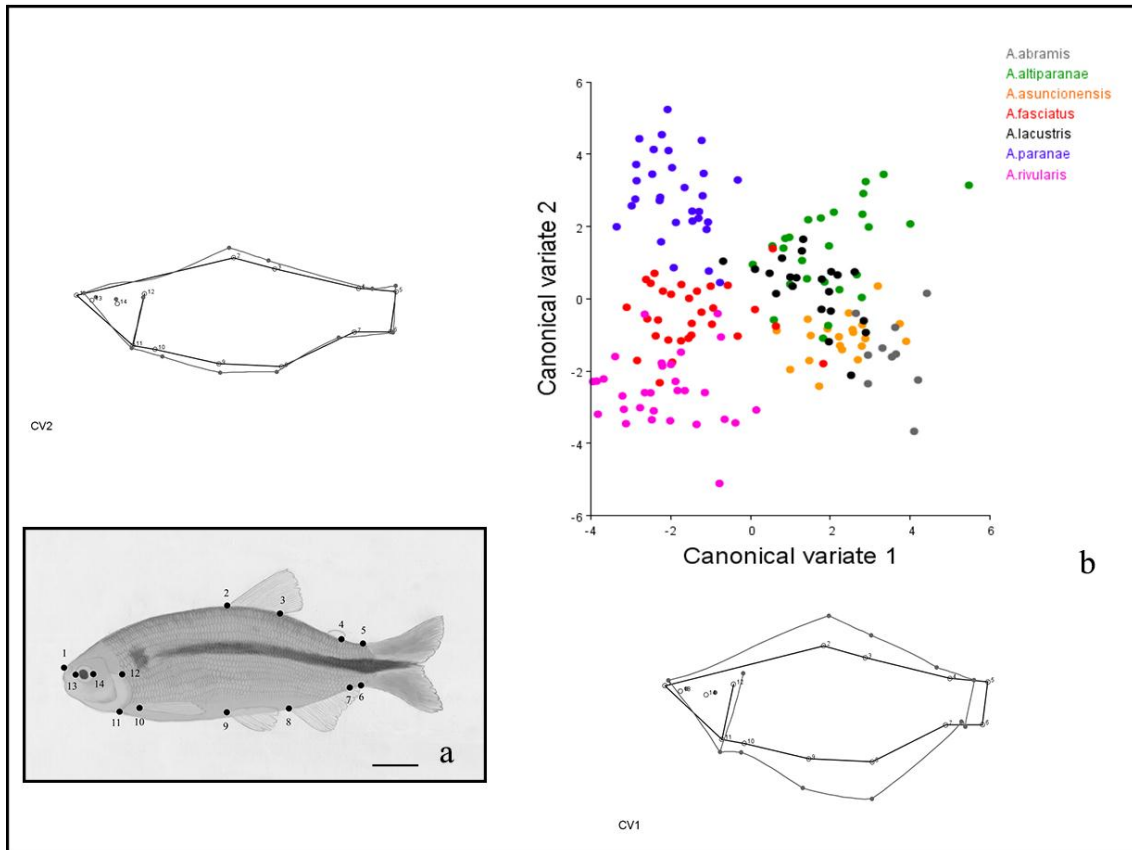


Figura 3: a - Conjunto de marcos anatômicos em exemplar de *A. rivularis*, barra=2cm; b - Análise de variáveis canônicas (CVA) com as unidades evolutivas em estruturação. A CV1 dobrou a grade nos marcos anatômicos relacionados à altura e a CV2 em relação aos marcos que estão relacionados às poucas curvaturas.

Material suplementar

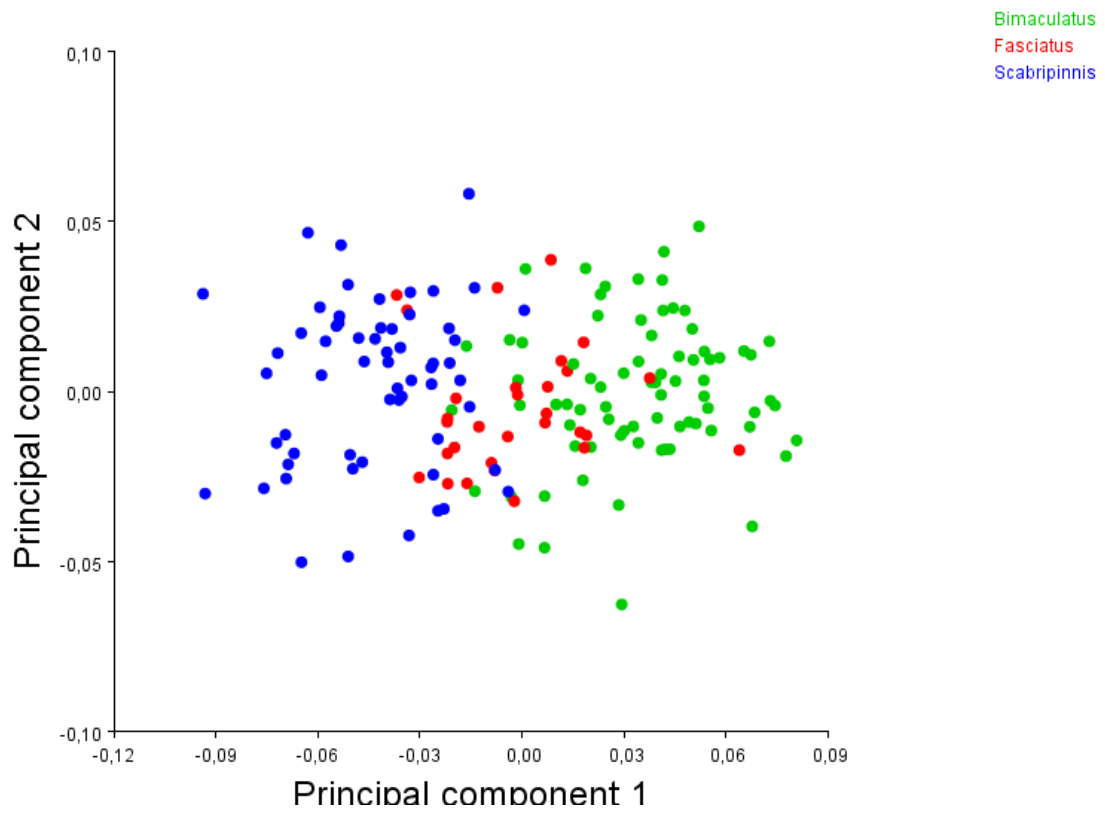


Fig S1: PCA indicando a estruturação visual dos três complexos no morfoespaço.

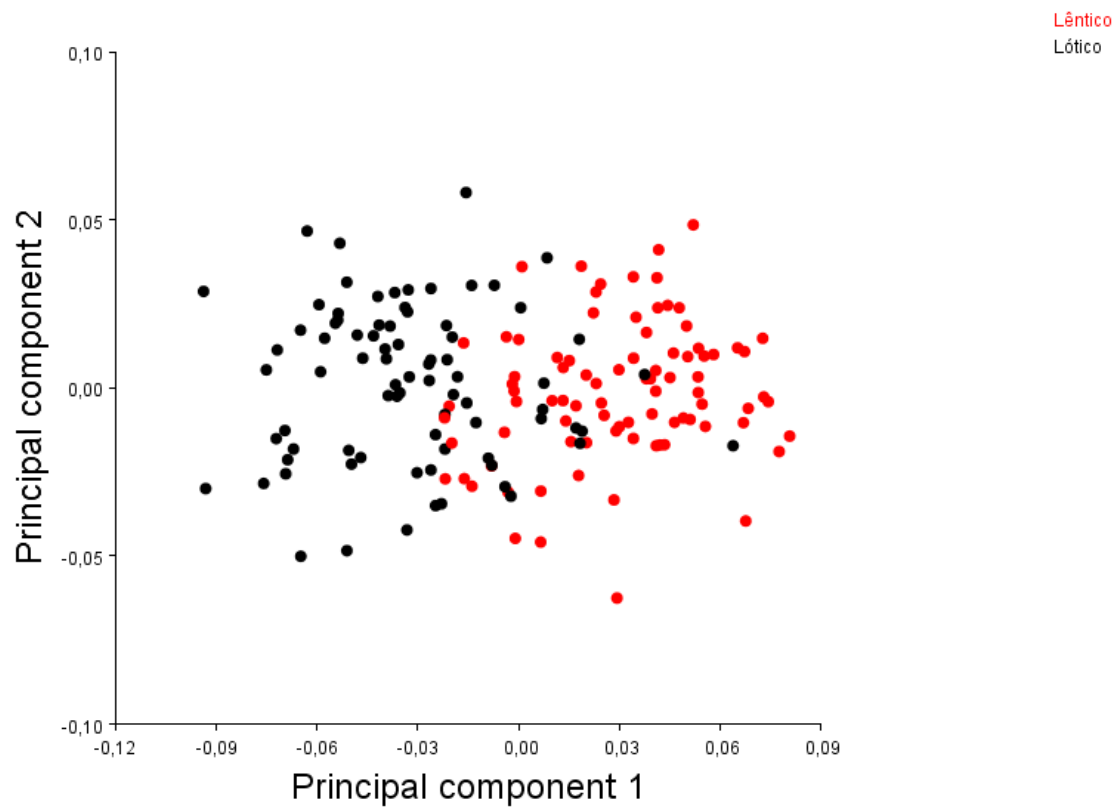


Fig S2: PCA indicando a estruturação visual dos scores classificados por tipo de ambiente no morfoespaço.

Anexos

Protocolo adaptado de morfometria geométrica

Fotografia:

- Preparar a bancada com veludo preto;
- Posicionar o tripé e regular a altura de acordo com o tamanho dos espécimes;
- Regular o zoom da câmera de acordo com o tamanho dos espécimes;
- Preparar etiquetas com espécie, voucher e ponto de amostragem;
- Ative ou não o flash de acordo com a luminosidade disponível;
- Posicione o espécime com a face esquerda do corpo para cima (Characiformes) ou com o dorso para cima (Siluriformes);
- Fotografe.

Obs: As fotografias devem ser tiradas pela mesma pessoa.

tpsUtil:

- Renomear todos os arquivos de imagem de acordo com a etiqueta;
- Após abrir o programa tpsUtil > select operation > built tps files from images > input > clique na primeira imagem da pasta > output > nomeie o arquivo de saída. tps > compute.

tpsDIG:

- Abra o programa tpsDIG > file > input source > selecione seu arquivo > options > image tools > clear > selecione “1 centimeters” > Set Scale > Ok. Mode > Digitalize

landmarks > clique sobre a figura escolhendo os marcos anatômicos homólogos > Save data as... xxxx.tps.

MorphoJ:

-Abra o programa MorphoJ > Create New Dataset > Preliminaries > New procrustes fit > Perform procrustes fit.

> Preliminaries > Edit classifiers > separar os grupos de acordo com seu estudo (populações, espécies).

> Project tree > newDataset > Covariation > Regression > Dependent variable(s): Datasets – newDataset; Data matrices - newDataset, Procrustes coordinates; Variables - Procrustes coordinates _ Independent variable(s): Datasets – newDataset; Data matrices – newDataset, centroid size; Variables – Centroid Size > Perform permutation test, Number of rounds: 10000 > Pooled regression within subgroups > Execute.

> Project Tree > Regression, results > Generate Covariance Matrix > Selected: Regression, results – Data types: Regression residuals > Pooled within-group covariances > Execute.

> Project Tree > CovMatrix, Regression, results, RegResid, pooled by xxx, > Variation > Principal Component Analysis.

>Project Tree > CovMatrix, Regression, results, RegResid, pooled by xxx, > Comparison > Canonical Variate Analysis > Dataset: Regression, results – Data type: Residuals, Regression > Permutation test for pairwise distances – Number of iterations: 10000 > Execute

Regras de formatação textual do periódico *Acta Zoologica*

Format

Title Page

Title, name(s) of author(s), institution(s), full address(es), email address(es) and a condensed title of up to 45 characters to be used as the running head.

The names, emails and Institutions of all of the authors included in the paper

The names, Institutions and emails of two suggested reviewers. Please do not suggest scientists based in your own institution or close collaborators elsewhere, as this will be viewed as a conflict. It is at the discretion of the Editors whether the suggested reviewers are approached for a review.

If the manuscript is a revision or re-submission, please upload a point-by-point response statement in the 'Response to decision letter' field. Please do not upload this as a manuscript file. Major changes to the text should be emboldened or underlined to assist reviewers with re-evaluation

Headings

Four grades of headings may be used:

A new line, full out left, initial capital letter main words, bold type; following text on new line not indented; [example *Format*]

B new line, full out left, initial capital letter first word only, italic; following text on new line not indented; [example *Headings*]

C new line, full out left, initial capital letter first word only, italic; text follows on same line after full point; [example *Principal (A) headings*]

D new line, indented, initial capital letter first word only, italic; text follows on same line after full point; [example *Abstract*]

Please indicate the grade of headings clearly in the left margin of the manuscript. B, C and D headings should be underlined to indicate italics.

Principal (A) headings

The following A headings should be used as and where appropriate.

Abstract. This should be an informative, condensed version of the important results and discussions and should not exceed 200 words. The abstract should be preceded by bibliographic details and followed by the name and full postal address of the author to whom correspondence should be addressed.

Lester. S. M. 1988. Ultrastructure of adult ... *normani*. - *Acta Zoologica* (Stockholm) 69: 95-109. [abstract]

Susan M. Lester. Department of., CA 95616, U.S.A. E-mail: xxx@xxx.xx.xx (or fax number if e-mail is not available).

Introduction.

Materials and Methods.

Results.

Discussion/Conclusion.

[Acknowledgement(s).]

References

References in Articles

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the APA FAQ. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:10.1176/appi.ajp.159.3.483

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Text

Files should be formatted double-spaced with no hyphenation and automatic word wrap (no hard returns within paragraphs). Please type your text consistently, e.g. take care to distinguish between '1' (one) and l (Lower case L) and '0' (zero) and 'O' (capital O), etc.

Latin names of genera and species should be in italics or underlined to indicate italics. All other indications for the printer will be inserted by the editor.

Literature references in the text should have the following form:

'Hatschek (1877) described...' or 'The statement by Hatschek (1877, p. 506) 'Die Furchungselemente ... grösser' has been...' or 'As described earlier (Hatschek 1877; Reed and Cloney 1983*a, b*; Strathmann *et al.* 1972, fig. 2)...

Footnotes should generally be avoided.

Reference to figures and tables in the manuscript should have the following form: 'As shown in Fig. 3 and Table 1...' or 'The cells have many cilia (Fig. 3)'.