

MARINA SOUZA DA CUNHA

**BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DO LAMBARI DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO
Astyanax aff. bimaculatus (TELEOSTEI: CHARACIDAE) NO SUDESTE
BRASILEIRO, COM BASE EM PADRÕES DE VARIAÇÃO
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

Cunha, Marina Souza da, 1988-
C972b Biogeografia histórica do lambari de ampla distribuição
2014 *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei: Characidae) no sudeste
brasileiro, com base em padrões de variação citogenéticos e
moleculares / Marina Souza da Cunha. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Genética animal. 2. Lambari (Peixe) - Citogenética.
3. Lambari (Peixe) - Morfologia. 4. *Astyanax bimaculatus*.
5. *Astyanax altiparanae*. 6. *Astyanax lacustris*. 7. Brasil,
Sudeste. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 576

MARINA SOUZA DA CUNHA

**BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DO LAMBARI DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO
Astyanax aff. bimaculatus (TELEOSTEI: CHARACIDAE) NO SUDESTE
BRASILEIRO, COM BASE EM PADRÕES DE VARIAÇÃO
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento,
para obtenção do título de Magister
Scientiae.

APROVADA: 30 de Julho de 2014.

Reggiani Vilela Gonçalves

Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Coorientador)

Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico este trabalho às pessoas que me fizeram acreditar que a vida vale a pena ser
vívuda.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Clovis e Xica e a toda minha família pela paciência durante a minha ausência e desejos carinhosos de esperança, sucesso e felicidades no meu caminho escolhido. Em especial a minha tia Auxiliadora que já gastou mais de um milhão de reais comigo nestes anos todos! Sem uma boa estrutura não é possível construir nada.

Ao meu Par Ighor por me dizer que eu sou capaz. Obrigada pela felicidade de todos esses anos.

Ao meu Tudo Fred que fez da Universidade e da Biologia um lugar pra mim.

Aos amigos do Beagle, da Biologia, da Física e do Taekwondo, que estiveram ao meu lado seja no trabalho ou no rock! Em especial ao Lucas que me mandou as fotos de FISH 18S ☺

À república “um dia a casa cai” que me acolheu mesmo sem pagar as contas!

Ao Lúcio que aceitou me orientar no mestrado e, mesmo estando prestes a aposentar, dedicou seu tempo ao meu crescimento profissional.

Ao Jorge por me acolher todos esses anos no laboratório e por sempre corrigir o meu português. Essa é para você! Espero ter alcançado as suas expectativas.

À Reggiani pelo interesse e disponibilidade de fazer parte da minha banca.

À FAPEMIG pela bolsa de fomento, à Universidade Federal de Viçosa pela estrutura oferecida e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento que juntos contribuíram para conquista do meu título de Magister Scientiae.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
APÊNDICES	vii
RESUMO	viiiviii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS GERAIS	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 INTRODUÇÃO	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	133
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO	18
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Locais de coleta das populações de *Astyanax aff. bimaculatus* no sudeste brasileiro.....37
- Figura 2. A) Cariótipo corado com Giemsa de *Astyanax aff. bimaculatus* $2n=6m+20sm+18st+6t$; B1) NORs simples obtidas através de impregnação por prata nas seguintes populações: Lagoas Curi, Juiz de Fora, Marola e Tiririca, Córrego São Barolomeu (bacia do rio Doce) e rios São João (bacia do rio Pardo), Carangola e Paraíba do Sul (bacia do rio Paraíba do Sul); B2) NORs múltiplas com duas ou três marcações na população do rio Mucuri (bacia do rio Mucuri); B3) NORs múltiplas com duas ou três marcações na população do rio Piranga (bacia do rio Doce); B4) NORs múltiplas variando de duas a oito marcações na população do córrego Espírito Santo (bacia do rio Paraíba do Sul).....37
- Figura 3 Padrões heterocromáticos obtidos com a banda C nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*: A) Córrego Espírito Santo; B) Rio Paraíba do Sul; C) Rio Carangola; D) Rio Piranga; E) Córrego São Bartolomeu; F) Lagoa Curi; G) Lagoa Juiz de Fora; H) Lagoa Marola; I) Lagoa Tiririca; J) Rio Mucuri; L) Rio São João..... 39
- Figura 4 Padrões de banda C corados convencionalmente (coluna da esquerda) e corados com o fluorescente DAPI (coluna central). Comparação com lâminas sem bandeamento C coradas com DAPI (coluna da direita) nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*: A) Córrego Espírito Santo; B) Rio Paraíba do Sul; C) Rio Piranga; D) Rio Mucuri.....40
- Figura 5 Padrão de FISH 5S (sonda verde - coluna da esquerda) e 18S (sonda vermelha - coluna da direita) obtido nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*: A-B) Córrego Espírito Santo; C-D) Rio Paraíba do Sul; E-F) Rio Piranga; G-H) Córrego São Bartolomeu; I-J) Lagoa Curi; L-M) Lagoa Linguíça; N-O) Lagoa Tiririca; P-Q) Rio Mucuri.....42
- Figura 6 Filogenia do Haplogrupo I obtida com o gene COI das amostras sequenciadas das populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente.43
- Figura 7 Filogenia do Haplogrupo IIA obtida com o gene COI das amostras sequenciadas das populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. * indica politomia.43

Figura 8 Filogenia do Haplogrupo IIB obtida com o gene COI das amostras sequenciadas das populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. * indica politomia.44

Figura 9 Rede de haplótipos do gene COI gerada para as populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. As cores dos haplótipos correspondem à bacia hidrográfica de coleta: Bacia do Rio São Francisco = roxo, Bacia do Rio Jequitinhonha = azul claro, Bacia do Rio Pardo = verde escuro, Bacia do Rio Mucuri = laranja, Bacia do Rio Doce = verde claro, Bacia do Rio Paraíba do Sul = rosa, Bacia do Alto Paraná = azul escuro. Os valores nos ramos da rede de haplótipos representam o número de substituições nucleotídicas (exceto quando foi observada apenas uma substituição). Os pontos vermelhos indicam os haplótipos não amostrados e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos.45

LISTA DE TABELAS

Tabela I Locais de coleta e tamanho amostral das populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.46

Tabela II Variação cariotípica nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.47

Tabela III Variação no número e localização de NORs nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.49

Tabela IV Padrões heterocromáticos obtidos através da banda C nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.51

Tabela V Distância molecular dentro e entre haplogrupos obtida com as sequências do gene COI no complexo *Astyanax aff. bimaculatus*.52

APÊNDICES

Apêndice I Sequências do gene COI obtidas no GenBank das espécies *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax lacustris*, e dos grupos externos *Astyanax fasciatus* e *Piabina argentea*. 52

Apêndice II Filogenia obtida com o gene COI das amostras sequenciadas das populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (ingerência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. *indica politomia. Barra indica distância molecular obtida através da análise bayesiana. (Disponível apenas online). ..54

RESUMO

CUNHA, Marina Souza da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Biogeografia histórica do lambari de ampla distribuição *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) no sudeste brasileiro, com base em padrões de variação citogenéticos e moleculares.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

As espécies do gênero *Astyanax* apresentam ampla distribuição na região neotropical e apresentam poucas diferenças morfológicas, ecológicas e comportamentais, o que dificulta a classificação taxonômica desse táxon. A espécie nominal *Astyanax bimaculatus* foi descrita em 1758 por Linnaeus e, atualmente, espécies com duas manchas ovaladas que ocorrem em diversas bacias neotropicais são consideradas como pertencentes ao complexo *bimaculatus*. O objetivo deste trabalho foi determinar as características citogenéticas e moleculares (DNA mitocondrial) de 19 populações consideradas como pertencentes ao complexo *Astyanax bimaculatus* das bacias costeiras do sudeste de Minas Gerais utilizando coloração convencional, regiões organizadoras de nucléolos Ag-NORs, banda C, DAPI, FISH e o gene citocromo oxidase I - COI. Os dados foram comparados com outras espécies do complexo. O cariótipo $6m+20sm+18st+6t$ ocorreu em todas as populações, com Ag-NORs variando de dois a oito cromossomos marcados. A banda C mostrou marcações centroméricas e pericentroméricas, evidenciadas pelo fluorocromo DAPI. As sondas 18S e 5S marcaram apenas um par cromossômico respectivamente. A filogenia obtida com o gene COI indicou a presença de dois haplogrupos com grande distância molecular: o haplogrupo I mais aparentado com populações da bacia do rio São Francisco, enquanto o haplogrupo II subdividiu-se em um grupo mais aparentado com populações do alto Paraná (IIA) e outro grupo formado exclusivamente por haplótipos costeiros (IIB). A uniformidade cariotípica das populações costeiras é maior que a reconhecida em *Astyanax altiparanae*, sugerindo a persistência de grandes populações. Polimorfismos envolvendo padrões de banda C indicam que a adição e redução de blocos de heterocromatina são consideradas variações intraespecíficas. Os dados moleculares sugerem que as bacias costeiras receberam aporte de bacias continentais, com geodispersão mais recente de um haplogrupo costeiro, provavelmente relacionado com a dinâmica de confluência de bacias costeiras durante os períodos glaciais. A similaridade genética entre a bacia do rio São Francisco e as bacias costeiras indica que a espécie nominal *Astyanax lacustris* não representa um táxon válido. Enquanto a bacia do alto Paraná manteve uma

identidade molecular condizente com a existência do táxon nominal *Astyanax altiparanae* que, condizente com os dados citogenéticos, também ocorre na bacia do rio Paraíba do Sul. Conclui-se que o complexo *bimaculatus* no sudeste brasileiro é composto de três linhagens, englobando apenas duas espécies: *Astyanax* aff. *bimaculatus* presente no São Francisco e nas bacias costeiras e *A. altiparanae* presente no alto Paraná.

ABSTRACT

CUNHA, Marina Souza da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Historical biogeography of the wide distribution lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) on southeastern Brazil, based on cytogenetic and molecular data.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-adviser: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

The species of the genus *Astyanax* are widely distributed in the Neotropical region and have few morphological, ecological and behavioral differences, which complicates the taxonomic classification of this taxon. The nominal species *Astyanax bimaculatus* was described by Linnaeus in 1758 and currently species with two oval spots that occur in several Neotropical basins are considered as belonging to *bimaculatus* complex. The objective of this study was to determine the cytogenetic and molecular characteristics (mitochondrial DNA) of 19 populations currently assigned to *Astyanax bimaculatus* from complex coastal basins of southeastern Minas Gerais using conventional staining, nucleolar organizer regions Ag-NORs, C-band, DAPI, FISH and the gene cytochrome oxidase I - COI. Data were compared with other species of the complex. The karyotype $6m + 20 sm + 18 st + 6 t$ occurred in all populations, with Ag-NORs ranging from two to eight stained chromosomes. The C-banding showed centromeric and pericentromeric markings, evidenced by the fluorochrome DAPI. Fluorescent 18S and 5S rDNA probes marked one chromosome pair respectively. The phylogeny obtained with the COI gene indicated the presence of two haplogroups with large molecular distance between them: haplogroup I was more closely related to the populations of the São Francisco River Basin, while haplogroup II was subdivided into a group which was more related to populations from the upper Paraná (IIA) and another group formed exclusively by coastal haplotypes (IIB). The karyotype uniformity of coastal populations is greater than the recognized *Astyanax altiparanae*, suggesting the persistence of large populations. Polymorphisms involving C-band patterns indicate that the addition and reduction of heterochromatin blocks are compatible with intraspecific variation. The molecular data suggest that coastal basins received migrants from continental basins, with more recent geodispersal of a coastal haplogroup, probably related to the dynamic confluence of coastal basins during glacial periods. The genetic similarity between São Francisco River Basin and coastal basins indicates that the nominal species *Astyanax lacustris* does not represent a valid taxon. While the Upper Paraná Basin maintained a molecular

identity consistent with the existence of the nominal taxon *Astyanax altiparanae* that, agreeing with the cytogenetic data, also occurs in the Paraíba do Sul River Basin. It is concluded that the bimaculatus complex in southeastern Brazil is composed by three lineages, including only two species *Astyanax* aff. *bimaculatus* present in São Francisco and coastal basins and *A. altiparanae* present in the Upper Paraná.

1 **1 INTRODUÇÃO GERAL**

2 A ordem Characiformes é composta por 270 gêneros e 18 famílias, sendo a
3 família Characidae a maior e mais complexa (Reis et al., 2003). O monofiletismo da
4 família é aceito (Mirande, 2009; Oliveira et al., 2011), mas muitas de suas espécies
5 foram incluídas na condição de incertae sedis, incluindo todas as do gênero *Astyanax*
6 (Lima et al., 2003). *Astyanax* é o maior gênero da ordem Characiformes (Nelson, 2006)
7 apresentando 137 espécies válidas amplamente distribuídas na região neotropical do sul
8 dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Froese & Pauly, 2013).

9 Os peixes deste gênero são popularmente conhecidos como lambaris ou piabas e
10 estão entre as principais espécies de peixes de água doce da América do Sul (Santos &
11 Novaes, 2008). Apresentam pequeno porte e hábito alimentar onívoro, são importantes
12 como substrato trófico para espécies maiores (Andrian et al., 2001). Além disso, são
13 utilizados como iscas na pesca esportiva, peixes ornamentais, no combate às larvas de
14 pernilongos (Sato et al., 2006) e contribuem para a dispersão secundária de sementes
15 (ictiocoria), fato fundamental na preservação de matas ciliares (Andrian et al., 2001).
16 Essas espécies quase sempre possuem distribuição restrita a pequenos trechos das
17 drenagens, condição delicada sob o ponto de vista da conservação, visto que impactos
18 nessas áreas podem levar a extinções (Drummond et al., 2005). Estudos relacionados à
19 ecologia e dieta alimentar de lambaris indicam que a manutenção da mata ciliar e a
20 recuperação das áreas degradadas são de extrema importância para manutenção das
21 espécies em seus habitats naturais (Borba et al., 2008).

22 *Astyanax bimaculatus*, conhecido popularmente como lambari do rabo amarelo,
23 foi descrito em 1758 por Linnaeus para a região que se estende de Buenos Aires até a
24 bacia do rio Orinoco (Eigenmann, 1921). Hoje, a distribuição desta espécie é
25 considerada restrita ao norte da América do Sul, incluindo apenas o Panamá e a bacia
26 amazônica (Lima et al., 2003). Peixes com duas manchas, uma umeral de forma

27 horizontalmente ovalada e outra na base da cauda que se estende à extremidade dos
28 raios caudais medianos, ocorrem em muitas bacias da região neotropical e são
29 consideradas como um complexo de espécies provavelmente aparentadas (Garutti,
30 1999; 2003).

31 Vinte e duas espécies foram descritas dentro deste complexo como mostrado na
32 tabela 01 (Garutti, 1999; Bertaco & Garutti, 2007), sendo que apenas algumas foram
33 estudadas com ferramentas citogenéticas e/ou moleculares (Domingues et al., 2007;
34 Pamponet et al., 2008; Peres et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Kavalco et al., 2011;
35 Pereira et al., 2011; Prioli et al., 2012). Desta forma, faz-se necessária a reconstrução
36 das relações filogenéticas dentro deste grupo, para determinar a existência de grupos
37 naturais (Garutti, 2003) e para o reconhecimento das contribuições das bacias na
38 composição de comunidades de peixes das regiões periféricas (Albert & Reis, 2011).

39

40 Tabela 01. Espécies nominais que foram distinguidas dentro do complexo bimaculatus.

Espécie	Descrição	Localidade
A.abramis	(Jenyns, 1842)	Tipo: Rio Paraná, Rosário, Argentina Distribuição: Bacia Platina e Alto Amazonas-Orinoco (Países: Argentina, Brasil e Peru)
A. altiparanae	Garutti & Britski, 2000	Tipo: Rio Grande, São Paulo, Brasil Distribuição: Alto rio Paraná, Brasil
A. argyrimarginatus	Garutti, 1999	Tipo: Araguaças, Córrego Jaraguá, bacia do rio Araguaia, Goiás, Brasil Distribuição: Bacia do rio Araguaia, nos Estados de Goiás e Mato Grosso, Brasil

<i>A. asuncionensis</i>	Géry, 1972	Tipo: Rio Paraguai e alto rio Tocantins Distribuição: Paraguai e baixo Paraná, Brasil
<i>A. borealis</i>	Eigenmann, 1908	Tipo: Rio Magdalena e Cauca, Colômbia
<i>A. clavitaeniatus</i>	Garutti, 2003	Tipo: Alto rio Branco, Roraima, Brasil
<i>A. goyacensis</i>	Eigenmann, 1908	Tipo: Goiás, Brasil Distribuição: Drenagem do rio Araguaia, alto rio Vermelho, Goiás
<i>A. incaicus</i>	Tortonese, 1942	Tipo: Rio Zamora, Equador
<i>A. jacuhiensis</i>	Cope, 1894	Tipo: Jacuhy, Rio Grande do Sul, Brasil Distribuição: Jacui, Uruguai e rios costeiros do sul do Brasil (Países: Uruguai, Argentina e Brasil)
<i>A. lacustris</i>	(Lütken, 1875)	Tipo: Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil Distribuição: Leste do Brasil. Bacia do rio São Francisco, Brasil
<i>A. maculisquamis</i>	Garutti & Britski, 1997	Tipo: Pontes e Lacerda, bacia do rio Madeira, bacia Amazônica, Brasil Distribuição: Alto rio Guaporé, Brasil
<i>A. novae</i>	Eigenmann, 1911	Tipo: Rio Sapon, Prazeres, Bahia, Brasil Distribuição: Rios Tocantins e São Francisco, Estados do Maranhão, Tocantins e Bahia, Brasil

A. orthodus	Eigenmann, 1907	Tipo: Truando, Colômbia Distribuição: Bacia do rio Atrato, Colômbia
A. paraguayensis	(Fowler, 1918)	Tipo: Puerto Bertoni, Paraguai Distribuição: Bacia o rio Paraguai
A. rupununi	Fowler, 1914	Tipo: Rio Rupununi, Guiana
A. saltor	Travassos, 1960	Tipo: Rio Cachimbo, Pará, Brasil Distribuição: Brasil (?)
A. siapae	Garutti, 2003	Tipo: Bacia Casiquiare-Orinoco, Venezuela
A. superbus	Myers, 1942	Tipo: Rio Tamanaco em Camoruco, Venezuela Distribuição: Bacia do rio Portuguesa, Venezuela
A. unitaeniatus	Garutti, 1998	Tipo: Goiás, Iaciara, Ribeirão Macambira, Brasil Distribuição: Bacia do rio Paranã, drenagem do alto rio Tocantins, Brasil
A. utiariti	Bertaco & Garutti, 2007	Tipo: Rio Papagaio, drenagem do rio Tapajós, Mato Grosso, Brasil
A. validus	Géry, Planquette & Le Bail, 1991	Tipo: Rio Comté, riacho Bache, Guiana Francesa Distribuição: Guiana Francesa (?)
A. vittatus	Castelanau, 1855	Tipo: Bahia, Brasil

41 Referências: Garutti, 1999; Garutti, 2003; Lima et al., 2003; Bertaco & Garutti, 2007;
42 Garutti & Langeani, 2009; Garutti & Venere, 2009.

43

44 *Astyanax bimaculatus* deveria ser a denominação restrita a esta espécie para a
45 bacia amazônica do Suriname (Garutti & Britski, 2000), no entanto, todas as espécies
46 do “complexo *bimaculatus*” são assim denominadas até que recebam uma designação
47 específica (Kavalco et al., 2011). Baseado nisto, o presente estudo pretende ampliar as
48 informações citogenéticas e moleculares disponíveis sobre este grupo, contribuindo para
49 uma compreensão clara e objetiva da filogenia deste complexo de espécies na região
50 neotropical.

51 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 52 Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). Historical Biogeography of Neotropical Freshwater
53 Fishes. University of California Press. 407pg.
- 54 Andrian, I. F., Silva, H. B. R. & Peretti, D. (2001). Dieta de *Astyanax*
55 *bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência
56 do reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil. *Acta Scientiarum* **23**, 435–
57 440.
- 58 Bertaco, V. A. & Garutti, V. (2007). New *Astyanax* from the upper rio Tapajós
59 drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **5**,
60 25–30.
- 61 Borba, C. S., Fugi, R., Agostinho, A. A. & Novakowski, G. C. (2008). Dieta de
62 *Astyanax asuncionensis* (Characiformes, Characidae), em riachos da bacia do rio
63 Cuiabá, Estado do Mato Grosso. *Acta Scientiarum Biological Sciences* **30**, 39–45.
- 64 Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner,
65 R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the
66 São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA* **22**, 80–86.
- 67 Domingues, M. S., Vicari, M. R., Abilhoa, V., Wamser, J. P., Cestari, M. M., Bertollo,
68 L. A. C., Almeida, M. C. & Artoni, R. F. (2007). Cytogenetic and comparative
69 morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski,
70 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná Basin. *Neotropical Ichthyology*
71 **5**, 37–44.
- 72 Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A. & Antonini, Y.
73 (2005). Biodiversidade em Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
74 Segunda Edição. Pgs 72–81.
- 75 Eigenmann, C. H. (1921). The American Characidae. *Memoirs of the Museum of*
76 *Comparative Zoology* **43**, 209–310.

- 77 Froese, R. & Pauly, D. Editors 2013. FishBase. World Wide Web electronic
78 publication. Available at <http://www.fishbase.org>, version (10/2013). (último
79 acesso em 29 de outubro de 2013).
- 80 Garutti, V. (1999). Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes,
81 Characidae) procedente da bacia do rio Paraguaia, Brasil. *Revista Brasileira de*
82 *Bioogia* **59**, 585–591.
- 83 Garutti, V. (2003). Revalidação de *Astyanax rupununi* Fowler, 1914 (Teleostei,
84 Characidae) e descrição de duas espécies novas para o gênero. *Papéis Avulsos de*
85 *Zoologia, São Paulo* **43**, 1–9.
- 86 Garutti, V. & Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax*
87 (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as
88 demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciência e*
89 *Tecnologia da PUCRS. Série Zoologia* **13**, 65–88.
- 90 Garutti, V. & Langeani, F. (2009). Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann,
91 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **7**, 371–
92 376.
- 93 Garutti, V. & Venere, P. C. (2009). *Astyanax xavante*, a new species of characid from
94 middle rio Araguaia in the Cerrado region, Central Brazil (Characiformes:
95 Characidae). *Neotropical Ichthyology* **7**, 377–383.
- 96 Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandão, K. D. O., Garcia, C. & Almeida-Toledo, L. F.
97 (2011). Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group
98 *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae).
99 *Cytogenetic and Genome Research* **134**, 108–119.
- 100 Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Pezzi da Silva, J. F., Vari, R. P.,
101 Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O. T., Pavanelli, C. S., Menezes, N. A., Lucena,
102 C. A. S., Malabarba, M. C. S. L., Lucena, Z. M. S., Reis, R. E., Langeani, F.,

- 103 Casatti, L., Bertaco, V. A., Moreira, C. & Lucinda, P. H. F. (2003). Genera Incertae
104 Sedis in Characidae. In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central
105 America (Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. J, eds), pp. 106–169. Porto
106 Alegre, Edipucrs, Brasil.
- 107 Mirande, J. M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae
108 (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* **25**, 574–613.
- 109 Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*, 4th edn. John Wiley and Sons, Inc. New
110 York. 624pg.
- 111 Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Orti, G., Vari,
112 R. P. & Correa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the
113 speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on
114 multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *Evolutionary Biology* **11**, 275–
115 300.
- 116 Pamponet, V. C. C., Carneiro, P. L. S., Affonso, P. R. A. M., Miranda, V. S., Silva
117 Junior, J. C., Oliveira, C. G. & Gaiotto, F. A. (2008). A multi-approach analysis of
118 the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758
119 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **6**, 621–
120 630.
- 121 Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, H., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). DNA
122 barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São
123 Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* **22**, 71–79,
- 124 Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2008). Physical mapping of
125 the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei,
126 Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 222–226.
- 127 Prioli, A. J., Carlo, V. A., Soria, T. V., Prioli, S. M. A. P., Pavanelli, C. S., Prioli, R. A.,
128 Gomes, V. N., Júlio Jr., H. F. & Prioli, L. M. (2012). Mitochondrial D-loop

- 129 nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná
130 and upper Paraguay River Basins. *Genetics and Molecular Research* **11**, 1064–
131 1074.
- 132 Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C. J. (2003). Checklist of the Freshwater
133 fishes of Central and South America. Edipucrs, PUC, Porto Alegre, RS. 729p.
- 134 Santos, A. C. A. & Novaes, J. L. C. (2008). Population structure of two *Astyanax* Baird
135 & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) species from Upper Paraguaçu River.
136 *Brazilian Archives of Biology and Technology* **51**, 105–112.
- 137 Sato, Y., Sampaio, E. V., Fenerich-Verani, N. & Verani, J. R. (2006). Biologia
138 reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes,
139 Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira*
140 *de Zoologia* **23**, 267–273.

141 **2 OBJETIVOS**

142

143 **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

144

145 Determinar a composição genética das populações do complexo *Astyanax aff.*
146 *bimaculatus* das bacias costeiras do sudeste de Minas Gerais e a relação filogeográfica
147 destas bacias com as bacias continentais, utilizando marcadores citogenéticos e
148 moleculares.

149

150 **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

151

152 I. Caracterizar citogeneticamente as populações do complexo *Astyanax aff.*
153 *bimaculatus* de bacias localizadas no leste de Minas Gerais, utilizando dados
154 relativos ao cariótipo, regiões de heterocromatina, regiões organizadoras de
155 nucléolo, marcadores fluorescentes e hibridização *in situ*. Comparar esses
156 padrões com outras espécies do complexo *bimaculatus*.

157

158 II. Caracterizar molecularmente as populações costeiras do complexo *Astyanax aff.*
159 *bimaculatus* do sudeste de Minas Gerais, utilizando o fragmento de citocromo-
160 oxidase subunidade I COI. Comparar esses padrões com outras espécies do
161 complexo *bimaculatus*.

162

163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182

ARTIGO

**BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DO LAMBARI DE AMPLA DISTRIBUIÇÃO
Astyanax aff. bimaculatus (TELEOSTEI: CHARACIDAE) NO SUDESTE
BRASILEIRO, COM BASE EM PADRÕES CITOGENÉTICOS E
MOLECULARES**

Marina Souza da Cunha

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia Geral,
Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, 36570-900,
Minas Gerais, Brasil.

183 3 INTRODUÇÃO

184 A família Characidae, a maior e mais complexa da ordem Characiformes, ocorre
185 nas Américas e na África (Nelson, 2006) e apresenta 1.345 espécies reconhecidas na
186 região neotropical (Albert et al., 2011a). Embora o monofiletismo da família seja aceito
187 (Mirande, 2009; Oliveira et al., 2011), muitas das suas espécies foram incluídas na
188 condição de incertae sedis, incluindo todas as do gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003),
189 conhecidas comumente como lambaris. Dados morfológicos (Mirande, 2009; 2010) e
190 moleculares (Javonillo et al., 2010; Oliveira et al., 2011) corroboram que parte dos
191 gêneros considerados incertae sedis não são monofiléticos e são referidos como “clado
192 C” (Oliveira et al., 2011). Na região Neotropical, a distribuição da maioria das espécies
193 é restrita a uma ou poucas bacias (Albert et al., 2011b). Porém, dentro da ordem
194 Characiformes, *Astyanax aff. bimaculatus* ocorre em 40 das 43 ecorregiões na América
195 do Sul (Abell et al., 2008).

196 *Astyanax* é o maior gênero da ordem Characiformes (Nelson, 2006) com 137
197 espécies válidas do sul dos Estados Unidos à Argentina (Froese & Pauly, 2013). Os
198 peixes deste gênero estão entre as espécies de água doce mais frequentes da América do
199 Sul (Santos & Novaes, 2008), ocupando pequenas lagoas com águas paradas até rios de
200 grande porte com áreas de correnteza e em diferentes altitudes (Froese & Pauly, 2013).
201 *Astyanax* spp. são onívoros, de pequeno porte e importantes como substrato trófico para
202 espécies maiores (Andrian et al., 2001). São exclusivamente de água doce com poucas
203 diferenças morfológicas, ecológicas e comportamentais entre si (Gurgel, 2004), o que
204 dificulta sua classificação taxonômica.

205 A espécie nominal *Astyanax bimaculatus* foi descrita em 1758 por Linnaeus,
206 com localidade-tipo a “América Meridional,” ocorrendo desde a província de Buenos
207 Aires ao Orinoco (Lima et al., 2003). Sua característica mais marcante é a presença de
208 duas manchas, uma umeral de forma horizontal ovalada e outra na base da cauda até a

209 extremidade dos raios caudais. Populações de peixes com esta característica ocorrem em
210 diversas bacias neotropicais e são consideradas um complexo de espécies (Garutti,
211 1999; 2003), onde vinte e duas espécies nominais já foram descritas (Garutti, 1999;
212 Bertaco & Garutti, 2007). No entanto, existem estudos citogenéticos e/ou moleculares
213 em apenas sete (Carvalho et al., 2011; Domingues et al., 2007; Kavalco et al., 2011;
214 Pacheco et al., 2011; Pamponet et al., 2008; Pereira et al., 2011; Peres et al., 2008;
215 Prioli et al., 2012; Santos et al., 2013; Silva et al., 2012; Tenório et al., 2013).

216 O sudeste brasileiro é considerado uma das regiões periféricas de distribuição de
217 peixes neotropicais de água doce e é de particular interesse biogeográfico por ter alto
218 grau de endemismo e baixa riqueza de espécies (Albert et al., 2011b). Considerando que
219 as populações de *Astyanax aff. bimaculatus* das bacias do sudeste brasileiro não têm
220 sido estudadas com técnicas citogenéticas e moleculares, este estudo visou a
221 caracterização citogenética e molecular de 19 populações do complexo *bimaculatus* das
222 seguintes bacias: Paraíba do Sul, Doce, Mucuri, Pardo e Jequitinhonha e de uma porção
223 da bacia do rio São Francisco para integrar seus padrões de variação com outras
224 espécies do grupo e contribuir para uma compreensão mais objetiva da filogenia deste
225 complexo de espécies na região neotropical. Conforme Abell et al. (2008), as
226 subregiões analisadas foram ER 344 e ER 327 (alto Paraná e São Francisco) e as bacias
227 costeiras, as ER 328 (bacia do rio Paraíba do Sul) e ER 329 (costeiras ao norte dessa
228 bacia).

229

230 **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

231 Cento e setenta e cinco indivíduos de *Astyanax aff. bimaculatus* foram coletados
232 em seis bacias do sudeste de Minas Gerais, Brasil (Fig. 1 e Tabela I), com a permissão
233 de coleta SISBIO14975-1 fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade
234 (ICMBio). Esses espécimes foram depositados na coleção científica do Museu de

235 Zoologia João Moojen em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (lotes MZUFV3552,
236 MZUFV3572, MZUFV3575, MZUFV3595, MZUFV3651, MZUFV3682,
237 MZUFV3753, MZUFV3869, MZUFV3989, MZUFV4094, MZUFV4103,
238 MZUFV4105, MZUFV4122, MZUFV4124 e MZUFV4134).

239

240 **4.1 ANÁLISES CITOGENÉTICAS**

241 Os peixes foram anestesiados e eutanasiados com solução aquosa de óleo de
242 cravo na concentração de 300 mg.L⁻¹ (Lucena et al., 2013), conforme aprovado pela
243 autorização 058/2013 do Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa. Os
244 cromossomos mitóticos metafásicos foram obtidos conforme Bertollo et al.(1978). Os
245 seguintes padrões citogenéticos foram obtidos: heterocromatina constitutiva evidenciada
246 com banda C (Sumner, 1972), regiões organizadoras de nucléolo com bandejamento
247 NOR (Howell & Black, 1980), fluorescência com DAPI (Schweizer, 1976) e
248 hibridização in situ (FISH) com as sondas 18S e 5S rDNA (Pinkel et al., 1986). O
249 registro fotográfico foi feito em microscópio Olympus U-TV0 63XC. Os cariótipos
250 foram medidos com auxílio do software Image-Pro Plus® e classificados seguindo a
251 razão de braços (RB) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos
252 (st) e telocêntricos (t) (Levan et al., 1964).

253

254 **4.2 ANÁLISES MOLECULARES**

255 O DNA foi extraído com CTAB (Boyce et al., 1989) e o gene mitocondrial
256 utilizado foi o Citocromo Oxidase I (COI), amplificado com os primers Fish F1T1 e
257 Fish R1T1 (Ward et al., 2005). As reações de PCR para COI foram realizadas em um
258 volume de 12,5 µL [8,57 µL de H₂O; 1,25 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH
259 8,4, 500 mM KCl), 0,31 µL de MgCl₂ (100 mM), 0,05 µL dNTPs (20 mM), 0,12 µL de
260 cada primer (10µM), 0,0625 µL (2.5 U) de Taq polimerase (Phoneutria) e 2µL de DNA

261 (100 ng/ μ l)]. Os fragmentos foram amplificados em 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C,
262 40 segundos a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, com desnaturação inicial do DNA a 94 °C por
263 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto amplificado foi purificado
264 com precipitação salina (PEG 8000) (20% polyethyleneglycol, 2,5 M NaCl) e
265 sequenciados na Macrogen (Korea).

266 As sequências foram alinhadas com CLUSTAL W (Higgins et al., 1994)
267 implementado no software MEGA 5.2.2 (Tamura et al., 2011). A análise de máxima
268 parcimônia (MP) foi realizada com o software PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) e as
269 buscas heurísticas consistiram em 1000 adições aleatórias das sequências com o
270 algoritmo TBR. O sinal filogenético foi estimado usando 1000 pseudorreplicações de
271 bootstrap (Felsenstein, 1985). A inferência bayesiana (MB) foi realizada com o software
272 MrBayes versão 3.1 (Huelsenbeck et al., 2001) para dez milhões de cadeia Markov
273 Monte Carlo (MCMC) e uma árvore filogenética amostrada a cada mil gerações. Vinte
274 e cinco por cento das árvores iniciais foram descartadas, sendo as restantes utilizadas
275 para a topologia de consenso. O suporte estatístico foi obtido na forma de probabilidade
276 posterior; o modelo de evolução molecular selecionado com base no critério de
277 informação de Akaike AIC, em software MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). *Astyanax*
278 *fasciatus* (Cuvier 1819) e *Piabina argentea* Reinhardt 1867 foram usados como grupos
279 externos.

280 A distância molecular entre e dentro dos haplogrupos foi estimada com o
281 software MEGA 5.2.2 (Tamura et al., 2011). Os sítios polimórficos do gene COI foram
282 estimados utilizando o software DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2003) e a rede de
283 haplótipos construída com o software Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd.)
284 baseada no algoritmo Median Joining (MJ) (Bandelt et al., 1999). O teste de
285 neutralidade Tajima's D (Tajima, 1989) foi realizado em software DnaSP v.5 (Librado
286 & Rozas, 2009) para os haplogrupos observados nas árvores filogenéticas.

287 As sequências foram depositadas no GenBank (números de acesso XXX). A
288 análise foi complementada com sequências de DNA do gene COI das espécies *Astyanax*
289 *altiparanae* Garutti & Britski 2000, *A. bimaculatus* (Linnaeus 1758) e *Astyanax*
290 *lacustris* (Lütken 1875) disponíveis no Genbank (Apêndice SI).

291

292 **5 RESULTADOS**

293 **5.1 RESULTADOS CITOGENÉTICOS**

294 Todas as populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* apresentaram o cariótipo
295 6m+20sm+18st+6t (Fig. 2A, Tabela II), sem cromossomos sexuais diferenciados. A
296 quantidade e localização das marcações de NORs foram variáveis nas populações
297 analisadas (Fig. 2B1-B4, Tabela III). O padrão de banda C mostrou marcações
298 centroméricas e pericentroméricas principalmente em cromossomos submetacêntricos e
299 subteloicêntricos, variando o número de cromossomos marcados entre as populações
300 (Fig. 3, Tabela IV). Foram comparadas marcações obtidas com DAPI em lâminas
301 marcadas apenas com este fluorocromo e em lâminas tratadas previamente com banda C
302 a fim de evidenciar as marcações de heterocromatina, indicando coincidência entre os
303 blocos heterocromáticos e regiões ricas em bases AT (Fig. 4). As sondas 18S rDNA e
304 5S rDNA apresentaram ambas marcações simples em todas as populações analisadas
305 (Fig. 5).

306

307 **5.2 RESULTADOS MOLECULARES**

308 Seiscentos e seis pares de bases (pb) do gene COI foram alinhados em 53
309 indivíduos, sendo adicionados outros 47 do GenBank. A análise de parcimônia foi feita
310 com 158 sítios variáveis e 127 filogeneticamente informativos. A razão
311 transição/transversão de 4,62 sugere que as taxas de substituições não estão saturadas. O

312 modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi GTR+G estimado
313 com o MrModeltest para construção da árvore bayesiana.

314 As árvores mostraram dois haplogrupos maiores (Apêndice SII) denominados
315 Haplogrupo I e Haplogrupo II. O primeiro incluiu populações costeiras e da bacia do
316 São Francisco e o segundo apresentou amostras da bacia do alto Paraná e do Paraíba do
317 Sul (haplogrupo IIA) e amostras exclusivamente costeiras (haplogrupo IIB). Esses
318 haplogrupos apresentam baixa distância molecular dentro de cada haplogrupo e alta
319 entre eles (Tabela V). O Haplogrupo I apresentou forte suporte estatístico na análise de
320 parcimônia e menor de bayesiana e incluiu dois subhaplogrupos com alto apoio
321 estatístico bayesiano: um compõe-se de *Astyanax aff. bimaculatus* do rio Piranga e da
322 lagoa Tiririca (bacia do rio Doce), dos rios Jequitinhonha (bacia do rio Jequitinhonha) e
323 Carangola (bacia do rio Paraíba do Sul), além de amostras de *A. lacustris* das seguintes
324 localidades na bacia do rio São Francisco: Represa de Três Marias e rio Paraopeba; o
325 outro subhaplogrupo foi formado por *Astyanax aff. bimaculatus* do rio Piranga e *A.*
326 *lacustris* das seguintes localidades na bacia do rio São Francisco: Lagoa Olária, Córrego
327 Neco, rios das Velhas e Santo Antônio e outros haplótipos sem parentesco resolvido
328 pertencentes ao ribeirão Galheiros, Represa de Três Marias, lagoa Olária, ribeirão Santo
329 Inácio, rio das Velhas, Paraopeba e Santo Antônio, todos da bacia do rio São Francisco
330 (Fig. 6).

331 O Haplogrupo IIA subdividiu-se em dois subhaplogrupos com forte suporte de
332 probabilidade posterior e bootstrap: um compõe-se de *Astyanax aff. bimaculatus* da
333 bacia do rio Paraíba do Sul e do córrego Espírito Santo pertencente a mesma bacia, além
334 de *A. altiparanae* da bacia do alto Paraná; o outro subhaplogrupo foi formado apenas
335 por *A. altiparanae* da bacia do alto Paraná (Fig. 7). O Haplogrupo IIB apresentou alto
336 valor de probabilidade posterior, porém menor valor de bootstrap e também apresentou
337 dois subhaplogrupos: o primeiro compõe-se de *Astyanax aff. bimaculatus* dos rios

338 Setúbal (bacia do rio Jequitinhonha), São João (bacia do rio Pardo) e Piranga (bacia do
339 rio Doce); enquanto o segundo subhaplogrupo foi composto apenas por *Astyanax aff.*
340 *bimaculatus* de bacias costeiras: rios Carangola, Muriaé, Pomba e Paraíba do Sul (bacia
341 do rio Paraíba do Sul), rio Piranga, lagoas Curi, Ferrugem, Juiz de Fora, Linguíça,
342 Marola e Tiririca, córregos Latão e São Bartolomeu (bacia do rio Doce) e rio Mucuri
343 (bacia do rio Mucuri) (Fig. 8).

344 A rede de haplótipos construída a partir do gene COI das amostras apresentou 27
345 haplótipos com valor de 0,9299 de diversidade haplotípica (Fig. 9). O teste de
346 neutralidade foi realizado para todos os haplogrupos e separadamente para os
347 haplogrupos I, IIA e IIB, mostrando que nenhum deles apresentou desvio significativo
348 da neutralidade. Para todas as amostras (N=100) Tajima's $D=0,9918$ ($P > 0,10$),
349 enquanto que o Haplogrupo I Tajima's $D=-0,3032$ ($P > 0,10$), o Haplogrupo IIA
350 apresentou $D=-0,3580$ ($P > 0,10$) e o haplogrupo IIB apresentou $D=-0,24781$ ($P > 0,10$).

351

352 **6 DISCUSSÃO**

353 **6.1 PADRÕES CITOGENÉTICOS**

354 A homogeneidade cariotípica de *Astyanax aff. bimaculatus* das bacias estudadas
355 contrasta com o indicado em outras populações do complexo *bimaculatus* (Tabela II),
356 particularmente em relação às populações de *A. altiparanae*, as quais apresentam maior
357 número de cromossomos telocêntricos. As populações de *A. altiparanae* apresentam tal
358 grau de variação cariotípica que são consideradas outro complexo de espécies
359 (Fernandes & Martins-Santos, 2004; Kavalco et al., 2011). Dentro do complexo
360 *bimaculatus*, a manutenção do número diploide $2n=50$ cromossomos (Pazza & Kavalco,
361 2007) com diferenças na fórmula cariotípica evidencia a ocorrência de rearranjos
362 cromossômicos não-robertsonianos, envolvendo principalmente inversões
363 pericentroméricas (Fernandes & Martins-Santos, 2004; Pazza & Kavalco, 2007),

364 constituindo uma notável diferença do padrão evolutivo com o complexo de espécies
365 *Astyanax fasciatus* (Cuvier 1819), onde ocorrem alterações no número diploide (Pazza
366 et al., 2006). Apesar da manutenção do número diploide, ocorrem cromossomos B em
367 *A. altiparanae* da bacia do rio Tietê (Hashimoto et al., 2008) e em *Astyanax goyacensis*
368 Eigenmann 1908 da bacia do rio Tocantins (Santos et al., 2013).

369 Nas populações analisadas neste estudo, as regiões organizadoras de nucléolo
370 (NORs) múltiplas foram restritas a um espécime do rio Mucuri (bacia do rio Mucuri), a
371 alguns espécimes do rio Piranga (bacia do rio doce) e à população do ribeirão Espírito
372 Santo (bacia do rio Paraíba do Sul) (Tabela III). Variações nos sítios marcados podem
373 ser causadas por diferenças de ativação dos sítios na última interfase celular (Sumner,
374 2003) ou devido ao tamanho dos mesmos, onde sítios pequenos são menos acessíveis à
375 impregnação por prata (Kavalco & Moreira-Filho, 2003). Em *A. altiparanae*, o uso do
376 corante fluorescente cromomicina A₃ mostrou que as metáfases nas quais ocorria um
377 par de NORs com impregnação por prata (Ag-NORs), apresentavam marcações
378 múltiplas com cromomicina A₃ (Fernandes & Martins-Santos, 2004). Já o padrão
379 observado nos indivíduos do ribeirão Espírito Santo é congruente com o fato dos
380 haplótipos sequenciados nesta população serem mais aparentados com *A. altiparanae*,
381 representado por duas linhagens dentro do haplogrupo IIA (Fig. 7 e Fig. 9). O padrão de
382 NORs com marcações múltiplas é comum no gênero *Astyanax* e é considerado um
383 caráter derivado para o gênero, com grande variação intraindividual e intrapopulacional
384 com, no mínimo, dois cromossomos representando os sítios preferenciais de ativação
385 transcricional (Kavalco & Moreira-Filho, 2003; Kavalco et al., 2011; Pacheco et al.,
386 2011; Pazza & Kavalco, 2007).

387 Blocos de heterocromatina nas populações analisadas ocorreram nas regiões
388 centroméricas e pericentroméricas, marcando principalmente cromossomos
389 submetacêntricos e subtelocêntricos. Isto também é observado nas populações de

390 *Astyanax* aff. *bimaculatus* das bacias dos rios Ribeira do Iguape e Guapimirim (Kavalco
391 et al., 2011), bem como em *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004;
392 Domingues et al., 2007), em *Astyanax argyrimarginatus* Garutti 1999 (Tenório et al.,
393 2013) e em outras espécies do gênero *Astyanax* (Kavalco et al., 2007). A maioria das
394 populações, com exceção da presente no rio São João, bacia do rio Pardo, apresentou
395 sítios heterocromáticos coincidentes com as regiões de NOR, padrão já observado em
396 outras populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*, *A. argyrimarginatus* (Tenório et al.,
397 2013) e *Astyanax jacuhiensis* (Cope 1894) (Pacheco et al., 2010). A concordância, em
398 alguns cromossomos, entre marcações com o corante fluorescente DAPI com e sem
399 tratamento prévio do bandeamento C indica que certas regiões heterocromáticas são
400 ricas em bases AT (Guerra, 2004) (Fig. 4).

401 Polimorfismos envolvendo padrões de banda C indicam que a adição e redução
402 de blocos de heterocromatina podem ser consideradas variações intraespecíficas e que
403 parte dessa variação pode ser homoplásica. Dados moleculares sugerem que as
404 populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* isoladas nas lagoas pleistocênicas do médio
405 rio Doce fazem parte da mesma espécie com outras amostras da calha do mesmo rio
406 (Paiva et al., 2006). Por outro lado, no mesmo sistema lacustre as populações do
407 caraciforme predador *Hoplias malabaricus* (Bloch 1794) apresentaram alterações nos
408 padrões de banda C, as quais foram interpretadas como evidência de processos
409 incipientes de especiação (Jacobina et al., 2011).

410 O padrão de marcação simples obtido com a sonda 18S rDNA foi consistente
411 nas populações que apresentaram NORs simples, exceto na população do ribeirão
412 Espírito Santo, que apresentou até oito cromossomos marcados com Ag-NORs e apenas
413 um par de sítios de 18S rDNA. Essa população tem mtDNA estreitamente aparentado
414 com *A. altiparanae* e o número mínimo de marcações de sítios 18S rDNA desta espécie
415 (Ferreira-Neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011). Em *A. altiparanae* não foi observada

416 correlação obrigatória entre as marcações de Ag-NOR e os sítios de 18S rDNA,
417 conforme observado na população do córrego Monjolinho, bacia do alto Paraná
418 (Tenório et al., 2013). A ausência de correlação entre essas duas técnicas pode ser
419 reflexo de marcações inespecíficas da prata, uma vez que a mesma marca indiretamente
420 os sítios organizadores do nucléolo através da marcação de proteínas argentofílicas
421 presentes nestes sítios (Howell, 1987), assim as marcas excedentes não confirmadas
422 pelo FISH seriam provavelmente regiões de heterocromatina com proteínas ácidas que
423 apresentam afinidade pela prata (Pacheco et al., 2011).

424 A maioria das espécies do complexo *bimaculatus* apresenta marcação simples de
425 18S rDNA, como *Astyanax aff. bimaculatus* do presente trabalho, além de populações
426 presentes na bacia do Tocantins-Araguaia (Tenório et al., 2013) e costeira o rio
427 Guapimirim (Kavalco et al., 2011), *A. jacuhiensis* da bacia do rio Tramandaí (Silva et
428 al., 2012), *A. lacustris* da bacia do rio São Francisco (Peres et al., 2008), assim como
429 algumas populações de *A. altiparanae* da bacia do alto Paraná (Domingues et al., 2007;
430 Ferreira-Neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011; Peres et al., 2008). Marcações múltiplas
431 de 18S rDNA são observadas em outras populações de *A. altiparanae* variando de dois
432 a sete cromossomos marcados (Domingues et al., 2007; Fernandes & Martins-Santos,
433 2006; Ferreira-Neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011); e na espécie *A. goyacensis* que
434 apresenta quatro cromossomos marcados (Santos et al., 2013).

435 A conservação da localização intersticial da sonda 5S rDNA em todas as
436 populações sugere que a posição destes cístrons dificulte a troca de material genético
437 com cromossomos vizinhos (Mantovani et al., 2005; Martins & Galetti Jr., 2001). Em
438 termos de número de marcações, o complexo *bimaculatus* apresenta dois padrões: no
439 primeiro observa-se um único par marcado, como neste estudo e em *Astyanax aff.*
440 *bimaculatus* das bacias costeira dos rios Ribeira do Iguape e Guapimirim (Kavalco et
441 al., 2011), em *A. goyacensis* da bacia do rio Tocantins (Santos et al., 2013) e em *A.*

442 lacustris da bacia do rio São Francisco (Peres et al., 2008); o segundo padrão refere-se à
443 ocorrência de dois pares de cromossomos marcados, conforme observado em *A.*
444 *argyrimarginatus* e *Astyanax* aff. *bimaculatus*, ambas presentes na bacia do rio
445 Araguaia (Tenório et al., 2013). *Astyanax altiparanae* apresenta padrões complexos de
446 5S rDNA, sendo que populações do mesmo local: córrego Monjolinho, bacia do alto
447 Paraná, apresentaram ora um par de marcações (Peres et al., 2008) ora dois pares de
448 marcações (Tenório et al., 2013). Dados de outras dez localidades mostram que a
449 marcação simples predomina nesta espécie (revisado em Pacheco et al., 2011).

450 A ocorrência de apenas um par de cromossomos portadores de 5S rDNA tem
451 sido considerada como uma característica sinapomórfica dentro do gênero *Astyanax*
452 (Almeida-Toledo et al., 2002; Vicari et al., 2008; Kavalco et al., 2011), porém tal
453 hipótese ainda deve ser testada através de análises filogenéticas mais formais, uma vez
454 que este caráter pode ser homoplásico, aumentando ou desaparecendo de forma
455 independente em diversas linhagens.

456

457 **6.2 DISCUSSÃO MOLECULAR**

458 A filogenia do gene COI das amostras de *Astyanax* aff. *bimaculatus*, somadas às
459 disponíveis no GenBank, mostrou-se bem resolvida com altos valores de probabilidade
460 posterior e de bootstrap para os grandes grupos e indicou a existência de dois
461 haplogrupos, sem estruturação geográfica entre as bacias. O haplogrupo I mais basal
462 reuniu haplótipos dos rios São Francisco, Doce, Jequitinhonha e Paraíba do Sul e indica
463 a existência de haplótipos de ampla distribuição em todas as bacias do sudeste
464 brasileiro, exceto na do alto Paraná. Após a dispersão para as bacias costeiras, estas
465 tiveram contato secundário com o São Francisco, mantendo a similaridade genética
466 entre ambas, indicando que o táxon nominal *Astyanax lacustris* não representa um clado
467 monofilético.

468 A existência do haplogrupo IIA, composto por amostras de *Astyanax aff.*
469 *bimaculatus* do ribeirão Espírito Santo (bacia do rio Paraíba do Sul) e amostras de *A.*
470 *altiparanae*, sugere que *A. altiparanae* apresenta uma distribuição costeira mais ampla
471 do que se acreditava, além da bacia costeira do rio Itatinga, na região de Bertioga,
472 estado de São Paulo (Serra et al., 2007). Este padrão consistente dos dados
473 citogenéticos e moleculares permite recuperar eventos de vicariância não evidentes na
474 análise de Ingenito & Buckup (2007) sobre os efeitos vicariantes da Serra da
475 Mantiqueira. A estreita relação entre populações do Paraíba do Sul e do alto Paraná já
476 tinha sido indicada no complexo *bimaculatus* com base em dados moleculares com o
477 gene COI (Pereira et al., 2011), assim como em populações de traíras *H. malabaricus*
478 (Santos et al., 2009). As amostras da bacia do alto Paraná sugerem uma identidade
479 molecular própria coincidente com *Astyanax altiparanae*.

480 A existência do haplogrupo IIB pode estar relacionada com eventos mais
481 recentes que afetaram a composição das comunidades costeiras de peixes. A
482 similaridade da ictiofauna entre as bacias costeiras do Brasil está fortemente
483 determinada pelos efeitos da variação do nível do mar durante os ciclos glaciais e
484 interglaciais. Durante os períodos glaciais, a diminuição do nível do mar e favorece a
485 confluência de rios adjacentes, permitindo a geodispersão de peixes entre as bacias. Por
486 outro lado, períodos interglaciais provocam elevação do nível do mar, fazendo com que
487 as partes inferiores das drenagens sejam inundadas por água salgada, resultando em
488 vicariância em peixes exclusivos de água doce (Pereira et al, 2013; Weitzman et al.,
489 1988). A existência de haplogrupos costeiros estreitamente aparentados foi também
490 demonstrada em *H. malabaricus* (Pereira et al., 2013) e pode ser comparada com as
491 espécies costeiras estreitamente aparentadas do caracídeo *Mimagoniates* (revisado em
492 Buckup, 2011).

493 Características morfológicas usadas para separar as espécies do complexo
494 *bimaculatus* são variáveis e se sobrepõem: embora a descrição morfológica de *A.*
495 *altiparanae* tenha sido feita com base em diversas localidades na bacia do alto Paraná, o
496 material comparativo de *A. lacustris* foi restrito a poucas localidades próximas à
497 barragem de Três Marias (Buckup, 2011). O mesmo ocorre com *A. altiparanae* e
498 *Astyanax asuncionensis* Géry 1972, onde a classificação taxonômica é feita mais pelo
499 local de coleta do que pela presença de caracteres morfológicos diagnósticos (Prioli et
500 al., 2012).

501 Na bacia do rio Doce, o padrão de variação morfológico e molecular (RAPD)
502 em *Astyanax* aff. *bimaculatus* foi interpretado por Paiva et al. (2006) como evidência de
503 existência de apenas uma espécie. Nossos dados indicam que essa população é
504 composta por duas linhagens: uma aparentada com indivíduos do rio São Francisco
505 (Haplogrupo I mais antigo), resultante de geodispersão e outra aparentada com
506 indivíduos costeiros (Haplogrupo IIB mais recente), como reflexo da dinâmica das
507 glaciações. Assim como no presente trabalho, a espécie *Piabina argentea* também
508 apresenta ampla distribuição entre as bacias brasileiras, ocorrendo nas bacias dos rios
509 São Francisco, do alto Paraná e em algumas bacias costeiras; dados filogenéticos
510 indicam geodispersão secundária desta espécie para as bacias costeiras (Ribeiro, 2006).

511 As distâncias moleculares com média de 3% entre os haplogrupos (Table V) são
512 superiores ao esperado para o nível de variação intraespecífica
513 (<http://www.fishbol.org/>), onde o valor máximo de variação é de 2% entre espécies e
514 4% entre gêneros (Ward, 2009). Distâncias moleculares altas dentro da mesma espécie
515 podem indicar a presença de espécies crípticas (Hebert et al., 2004). Altas divergências
516 são observadas em outros complexos de espécies, como *H. malabaricus*, em média 9%
517 de divergência (Pereira et al., 2013).

518 A falta de significância do teste de neutralidade Tajima's D leva à não rejeição
519 da hipótese nula, que prevê evolução neutra em uma população em equilíbrio. Em
520 outras palavras, a seleção natural não está agindo no locus estudado e a população não
521 experimentou nenhum crescimento ou contração recente (Tajima, 1989). Os resultados
522 não significativos do teste D em cada haplogrupo sugerem que a alta diversidade
523 haplotípica é resultado de mutações neutras agindo em grandes populações. O tamanho
524 efetivo das populações afeta as taxas de diversidade genética, como observado em
525 *Astyanax mexicanus* (De Filippi 1853), onde a baixa diversidade encontrada é reflexo
526 do tamanho efetivo pequeno mantido nestas populações (Brdic et al., 2012). Outro fato
527 que corrobora a existência de grandes populações é a ausência da fixação de rearranjos
528 cariotípicos nas populações costeiras do complexo *bimaculatus*, uma vez que a fixação
529 de rearranjos cromossômicos é geralmente associada a condições demográficas
530 envolvendo pequenas comunidades (revisado em King, 1987; Sites & Moritz, 1987).

531 Considerando os dados citogenéticos e moleculares, as populações do complexo
532 *bimaculatus* do sudeste são cromossomicamente mais homogêneas que as populações
533 do alto Paraná, sugerindo persistência de grandes populações. A similaridade genética
534 entre o São Francisco e as bacias costeiras indica que a espécie nominal *Astyanax*
535 *lacustris* não representa um táxon válido. Porém, as amostras da bacia do alto Paraná
536 mantiveram uma identidade molecular condizente com a existência de *Astyanax*
537 *altiparanae* que ocorre nas bacias do alto Paraná e do rio Paraíba do Sul. Conclui-se que
538 o complexo *bimaculatus* no sudeste brasileiro é composto de três linhagens, englobando
539 apenas duas espécies: *Astyanax* aff. *bimaculatus* presente no São Francisco e nas bacias
540 costeiras e *A. altiparanae* presente no alto Paraná e no Paraíba do Sul.

541

542 **Agradecimentos**

543 Lucas Caetano de Barros pelas fotos de FISH 18S rDNA. Ao Conselho Nacional
544 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de
545 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à
546 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

547

548 **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 549 Abell, R., Thieme, M., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad B.,
550 Mandrak, N., Balderas, S. C., Bussing, W., Stiassny, M. L. J., Skelton, P., Allen, G.
551 R., Unmack, P., Naseka, A., Rebecca, N. G., Sidorf, N., Robertson, J., Armijo, A.,
552 Higgins, J. V., Heibel, T. J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H. L., Reis, R.
553 E., Lundberg, J. G., Pérez, M. H. S. & Petry P. (2008). Freshwater ecoregions of
554 the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity
555 conservation. *BioScience* **58**, 403–414.
- 556 Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater*
557 *Fishes*. University of California Press. 407pg.
- 558 Albert, J. S., Bart Jr, H. L. & Reis, R. E. (2011a). Species richness and cladal diversity.
559 In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J. S. & Reis,
560 R. E., eds), pp. 89–104. University of California Press.
- 561 Albert, J. S., Petry, P. & Reis, R. E. (2011b). Major biogeographic and phylogenetic
562 patterns. In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J.
563 S. & Reis, R. E., eds), pp. 21–57. University of California Press.
- 564 Almeida-Toledo, L. F., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Bonillo, C., Porto-Foresti, F. &
565 Daniel-Silva, M. F. (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and
566 co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces,
567 Characidae). *Cytogenetic and Genome Research* **97**, 229–233.

- 568 Andrian, I. F., Silva, H. B. R. & Peretti, D. (2001). Dieta de *Astyanax*
569 *bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência
570 do reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil. *Acta Scientiarum*, **23**, 435–
571 440.
- 572 Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring
573 intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37–48.
- 574 Bertaco, V. A. & Garutti, V. (2007). New *Astyanax* from the upper rio Tapajós
575 drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **5**,
576 25–30.
- 577 Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic
578 considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de*
579 *Genética* **1**, 103–120.
- 580 Boyce, T. M., Zwick, M. E. & Aquadro, C. F. (1989). Mitochondrial DNA in the bark
581 weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* **123**, 825–836.
- 582 Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S. & Borowsky, R. L.
583 (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex
584 (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology* **12**, 9.
- 585 Buckup, P. A. (2011). The eastern brazilian shield. In *Historical Biogeography of*
586 *Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J. S. & Reis, R. E., eds), pp. 203–210.
587 University of California Press.
- 588 Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner,
589 R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the
590 São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA* **22**, 80–86.
- 591 Daniel-Silva, M. F. & Almeida-Toledo, L. F. (2001). Chromosome R-banding pattern
592 and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax*
593 (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* **54**, 209–215.

594 Domingues, M. S., Vicari, M. R., Abilhoa, V., Wamser, J. P., Cestari, M. M., Bertollo,
595 L. A. C., Almeida, M. C. & Artoni, R. F. (2007). Cytogenetic and comparative
596 morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski,
597 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná Basin. *Neotropical Ichthyology*
598 **5**, 37–44.

599 Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the
600 bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.

601 Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2004). Cytogenetic studies in two populations
602 of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* **141**, 328–332.

603 Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I. C. (2006). Mapping of the 18S and 5S ribosomal
604 RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei,
605 Characidae) from the upper Paraná river Basin, Brazil. *Genetics and Molecular*
606 *Biology* **29**, 464–468.

607 Ferreira-Neto, M., Vicari, M. R., Camargo, E. F., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O.
608 (2009). Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae*
609 (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). *Genetics and Molecular Biology* **32**,
610 792–796.

611 Garutti, V. (1999). Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes,
612 Characidae) procedente da bacia do rio Araguaia, Brasil. *Revista Brasileira de*
613 *Biologia* **59**, 585–591.

614 Garutti, V. (2003). Revalidação de *Astyanax rupununi* Fowler, 1914 (Teleostei,
615 Characidae) e descrição de duas espécies novas para o gênero. *Papéis Avulsos de*
616 *Zoologia, São Paulo* **43**, 1–9.

617 Guerra, M. (2004). Hibridização in situ: Princípios básicos. In *FISH: Fluorescent in situ*
618 *hybridization - conceitos e aplicações na citogenética*. (Guerra, M., eds), pp. 1–32.
619 Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

- 620 Gurgel, H. C. B. (2004). Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax*
621 *fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço
622 Branco, Rio Grande do Norte. Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **21**, 131–135.
- 623 Hashimoto, D. T., Gonçalves, V. R., Bortolozzi, J., Foresti, F. & Porto-Foresti, F.
624 (2008). First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax*
625 *altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* **31**,
626 275–278.
- 627 Hashimoto, D. T., Ferguson-Smith, M. A., Rens, W., Foresti, F. & Porto-Foresti, F.
628 (2011). Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three
629 Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*
630 **34**, 64–71.
- 631 Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification
632 of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* **2**, 1657–1663.
- 633 Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J.
634 (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence
635 alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight
636 matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- 637 Howell, W. M. (1987). Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins
638 associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* **62**,
639 361–367.
- 640 Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer
641 regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**,
642 1014–1015.
- 643 Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference
644 of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* **294**, 2310–2314.

- 645 Ingenito, L. F. S. & Buckup, P. A. (2007). The Serra da Mantiqueira, south-eastern
646 Brazil, as a biogeographical barrier for fishes. *Journal of Biogeography* **34**, 1173–
647 1182.
- 648 Jacobina, U. P., Paiva, E. & Dergam, J. A. (2011). Pleistocene karyotypic divergence in
649 *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) populations in
650 southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **9**, 325–333.
- 651 Javonillo, R., Malabarba, L. R., Weitzman, S. H. & Burns, J. R. (2010). Relationships
652 among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes),
653 based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**,
654 498–511.
- 655 Jin, S. N. & Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax*
656 *bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciência e Cultura* **27**, 1122–1124.
- 657 Kavalco, K. F. & Moreira-Filho, O. (2003). Cytogenetical analyses in four species of the
658 genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia*
659 **56**, 453–461.
- 660 Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2007). Satellite DNA
661 sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics*
662 *and Molecular Biology* **30**, 329–335.
- 663 Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandão, K. D. O., Garcia, C. & Almeida-Toledo, L. F.
664 (2011). Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group
665 *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae).
666 *Cytogenetic and Genome Research* **134**, 108–119.
- 667 King, M. (1987). Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical
668 approach. *Heredity* **59**, 1–6.
- 669 Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric
670 position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201–220.

- 671 Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of
672 DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.
- 673 Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Pezzi da Silva, J. F., Vari, R. P.,
674 Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O. T., Pavanelli, C. S., Menezes, N. A., Lucena,
675 C. A. S., Malabarba, M. C. S. L., Lucena, Z. M. S., Reis, R. E., Langeani, F.,
676 Casatti, L., Bertaco, V. A., Moreira, C. & Lucinda, P. H. F. (2003). Genera Incertae
677 Sedis in Characidae. In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central*
678 *America* (Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. J, eds), pp. 106–169. Porto
679 Alegre, Edipucrs, Brasil.
- 680 Lucena, C. A. S., Calegari, B. B., Pereira, E. H. L. & Dallegre, E. (2013). O uso de
681 óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*
682 **105**, 20–24.
- 683 Mantovani, M., Abel, L. D. S. & Moreira-Filho, O. (2005) Conserved 5S and variable
684 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis*
685 (Pisces, and Characidae). *Genetica* **123**, 211–216.
- 686 Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish
687 species: is it a general rule for fishes? *Genetica* **111**, 439–446.
- 688 Martinez, E. R. M., Alves, A. L., Silveira, S. M., Foresti, F. & Oliveira, C. (2012).
689 Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti and
690 *Britzki*, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes,
691 Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comparative Cytogenetics* **6**, 41–51.
- 692 Mirande, J. M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae
693 (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* **25**, 574–613.
- 694 Mirande, J. M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes):
695 from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* **8**, 385–568.

- 696 Morelli, S., Bertollo, L.A., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Toledo-Filho, S. A. (1983).
697 Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I.
698 Karyotypic variability. *Caryologia* **36**, 235–244.
- 699 Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*, 4th edn. John Wiley and Sons, Inc. New
700 York. 624pg.
- 701 Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author.
702 Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- 703 Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Orti, G., Vari,
704 R. P. & Correa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the
705 speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on
706 multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *Evolutionary Biology* **11**, 275–
707 300.
- 708 Pacheco, R. B., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2001). Cytotypes and multiple
709 NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae).
710 *Chromosome Science* **5**, 109–114.
- 711 Pacheco, R. B., Giuliano-Caetano, L., Júlio Jr., H. F. & Dias A. L. (2010). Cytogenetic
712 data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries,
713 Brazil. *Neotropical Ichthyology* **8**, 667–671.
- 714 Pacheco, R. B., Rosa, R., Giuliano-Caetano, L., Júlio Jr., H. F. & Dias, A. L. (2011).
715 Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax*
716 *altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the
717 localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetics* **5**, 237–246.
- 718 Paiva, S. R., Dergam, J. A. & Machado, F. (2006). Determining management units in
719 southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei:
720 Ostariophysi: Characidae). *Hydrologia* **560**, 393–404.

- 721 Pamponet, V. C. C., Carneiro, P. L. S., Affonso, P. R. A. M., Miranda, V. S., Silva
722 Junior, J. C., Oliveira, C. G. & Gaiotto, F. A. (2008). A multi-approach analysis of
723 the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758
724 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **6**, 621–
725 630.
- 726 Pazza R., Kavalco, K. F. & Bertollo, L. A. C. (2006). Chromosome polymorphism in
727 *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotypic analysis, Ag-NORs and
728 mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their
729 possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research* **112**, 313–319.
- 730 Pazza, R. & Kavalco, K. F. (2007). Chromosomal evolution in the Neotropical characin
731 *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *The Nucleus* **50**, 519–543.
- 732 Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, H., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). DNA
733 barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São
734 Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* **22**, 71–79,
- 735 Pereira, T., Santos, U., Schaefer, C. E., Souza, G. O., Paiva, S. R., Malabarba, L. R.,
736 Schmidt, E. E. & Dergam, J. A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias*
737 *malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian
738 continental margin. *Journal of Biogeography* **40**, 905–914.
- 739 Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2008). Physical mapping of
740 the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei,
741 Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 222–226.
- 742 Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986.) Cytogenetic analysis using quantitative,
743 high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy*
744 *of Sciences of the United States of America* **83**, 2934–2938.
- 745 Prioli, A. J., Carlo, V. A., Soria, T. V., Prioli, S. M. A. P., Pavanelli, C. S., Prioli, R. A.,
746 Gomes, V. N., Júlio Jr., H. F. & Prioli, L. M. (2012). Mitochondrial D-loop

747 nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná
748 and upper Paraguay River Basins. *Genetics and Molecular Research* **11**, 1064–
749 1074.

750 Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes
751 from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution
752 associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* **4**, 225–
753 246.

754 Santos, A. C. A. & Novaes, J. L. C. (2008). Population structure of two *Astyanax* Baird
755 & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) species from Upper Paraguaçu River.
756 *Brazilian Archives of Biology and Technology* **51**, 105–112.

757 Santos, L. P., Castro, J. P., Francisco, C. M., Vicari, M. R., Almeida, M. C., Goll, L. G.,
758 Morelli, S. & Artoni, R. F. (2013). Cytogenetic analysis in the neotropical fish
759 *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype
760 description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics* **6**, 48.

761 Schaefer, S. (2011). The Andes: Riding the Tectonic Uplift. In *Historical Biogeography*
762 *of Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J. S. & Reis, R. E., eds), pp. 259–278.
763 University of California Press.

764 Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and
765 DAPI. *Chromosoma* **58**, 307–324.

766 Serra, J. P., Carvalho, F. R. & Langeani, F. (2007). Ichthyofauna of the rio Itatinga in
767 the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo state: Composition and biogeography.
768 *Biota Neotropica* **7**, 81–86.

769 Silva, L. L. L., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2012). Chromosome Studies of
770 *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin,
771 Brazil, Using in situ Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA3
772 Staining. *Folia Biologica* **60**, 135–140.

- 773 Sites Jr, J. W. & Mortiz, C. (1987). Chromosomal evolution and speciation revisited.
774 *Systematic Zoology* **36**, 153–174.
- 775 Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric
776 heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304–306.
- 777 Sumner, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*.
778 North Berwick, United Kingdom. 294pg.
- 779 Swofford, D. L. (2002). PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other*
780 *Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 781 Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by
782 DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585–595.
- 783 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).
784 MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,
785 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and*
786 *Evolution* **28**, 2731–2739.
- 787 Tenório, R. C. C. O., Vitorino, C. A., Souza, I. L., Oliveira, C. & Venere, P. C. (2013).
788 Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on
789 the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* **11**, 553–564.
- 790 Vicari, M. R., Noleto, R. B., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C.
791 (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis*
792 complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular*
793 *Biology* **31**, 173–179.
- 794 Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA
795 barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*
796 *B: Biological Sciences* **360**, 1847–1857.
- 797 Ward, R. D. (2009). DNA Barcoding: DNA barcode divergence among species and
798 genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1077–1085.

799 Weitzman, S. H., Menezes, N. A. & Weitzman, M. J. (1988). Phylogenetic
800 biogeography of glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with
801 comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern
802 Brazil. In Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns
803 (Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R., eds), pp. 379–427. Academia Brasileira de
804 Ciências, Rio de Janeiro.

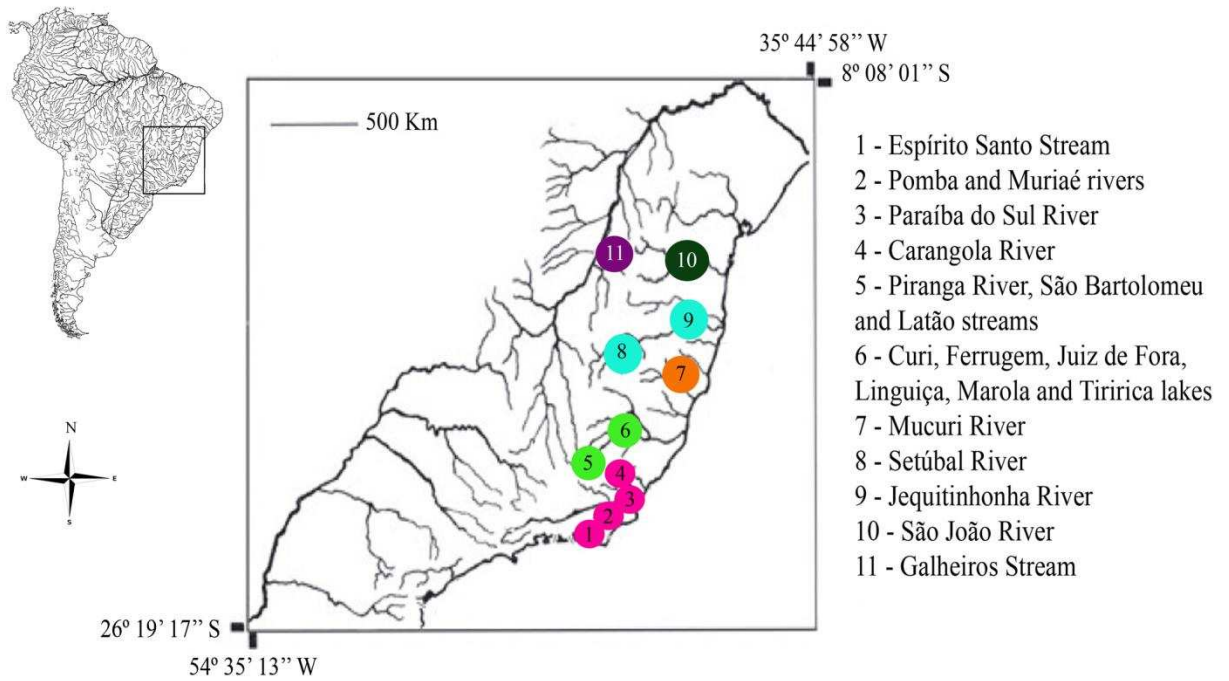
805

806 **REREFÊNCIAS ELETRÔNICAS**

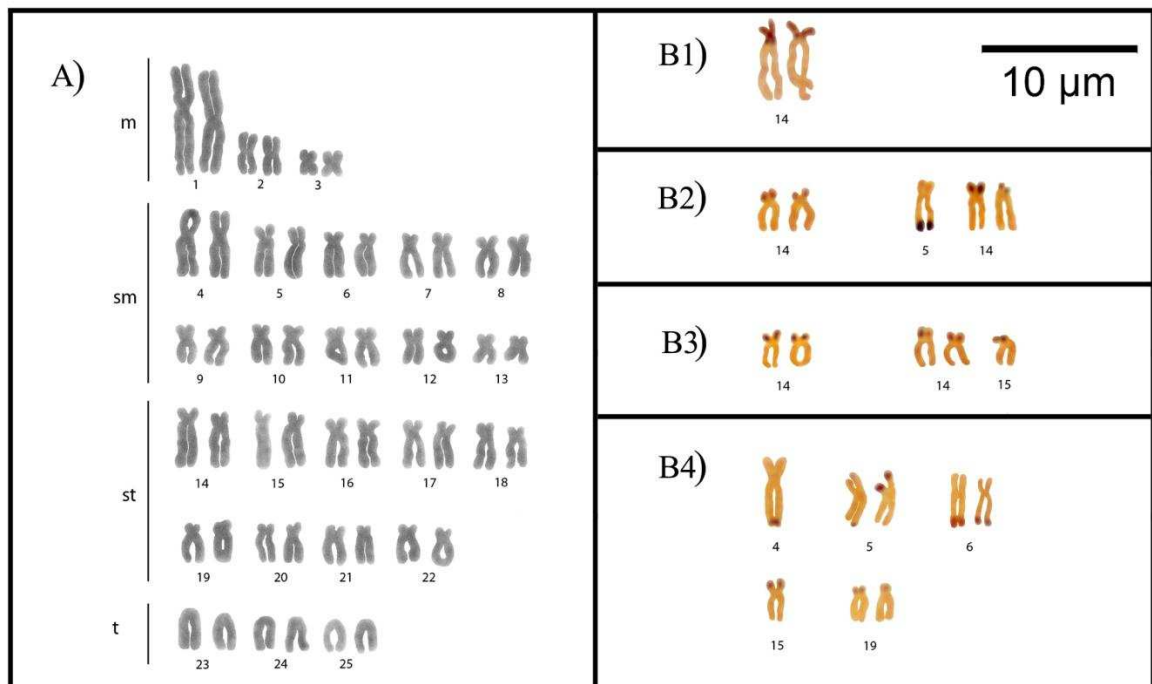
807 Fluxus Technology Ltd. Network © Copyright Fluxus Technology Ltd, 1999–2012.

808 Available at <http://www.fluxus-engineering.com>. (último acesso em 24 de
809 novembro de 2013).

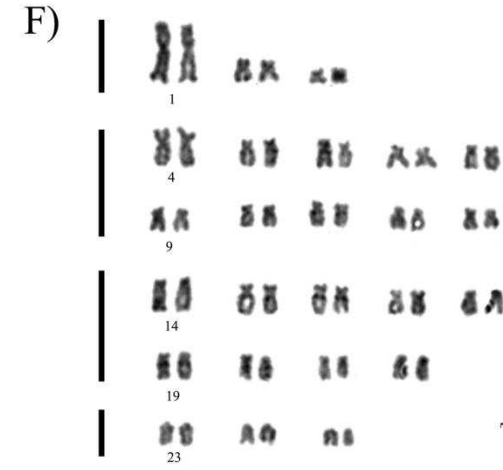
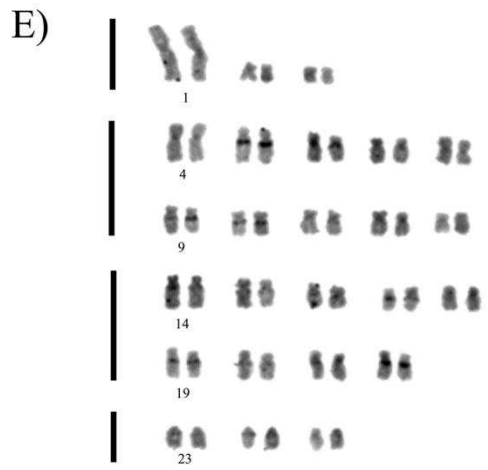
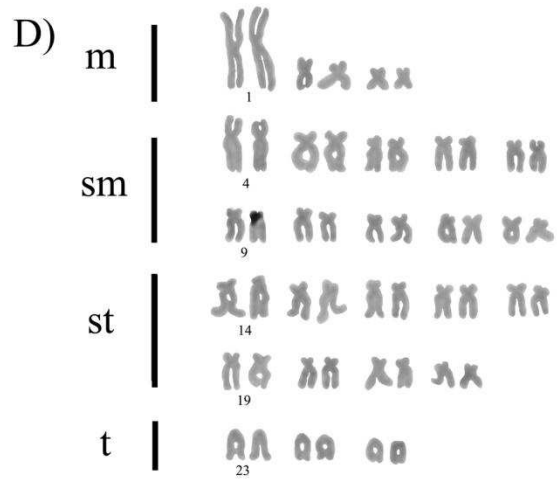
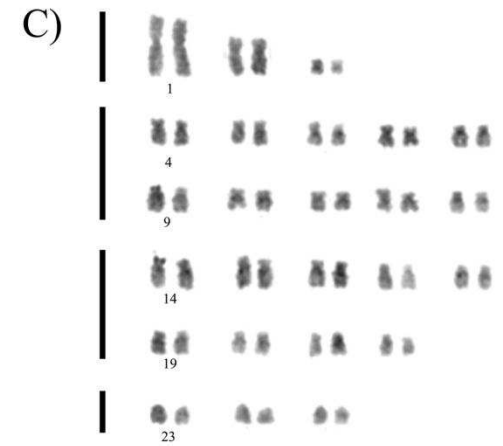
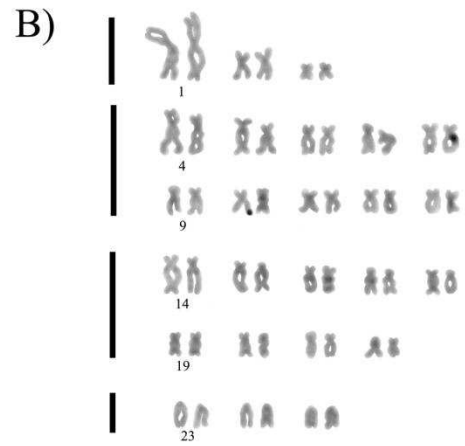
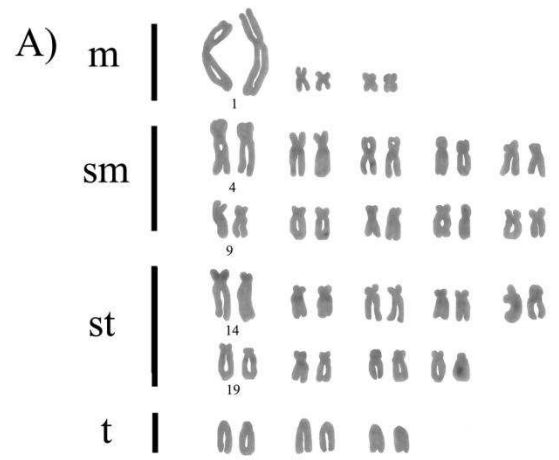
810 Froese, R. & Pauly, D. Editors 2013. FishBase. World Wide Web electronic
811 publication. Available at <http://www.fishbase.org>, version (10/2013). (último
812 acesso em 29 de outubro de 2013).



81:
814 Figura 1. Locais de coleta das populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* no sudeste
815 brasileiro.



816
817 Figura 2. A) Cariótipo corado com Giemsa de *Astyanax* aff. *bimaculatus*
818 $2n=6m+20sm+18st+6t$; B1) NORs simples obtidas através de impregnação por prata
819 nas seguintes populações: Lagoas Curi, Juiz de Fora, Marola e Tiririca, Córrego São
820 Barolomeu (bacia do rio Doce) e rios São João (bacia do rio Pardo), Carangola e
821 Paraíba do Sul (bacia do rio Paraíba do Sul); B2) NORs múltiplas com duas ou três
822 marcações na população do rio Mucuri (bacia do rio Mucuri); B3) NORs múltiplas com
823 duas ou três marcações na população do rio Piranga (bacia do rio Doce); B4) NORs
824 múltiplas variando de duas a oito marcações na população do córrego Espírito Santo
825 (bacia do rio Paraíba do Sul).



10 μm



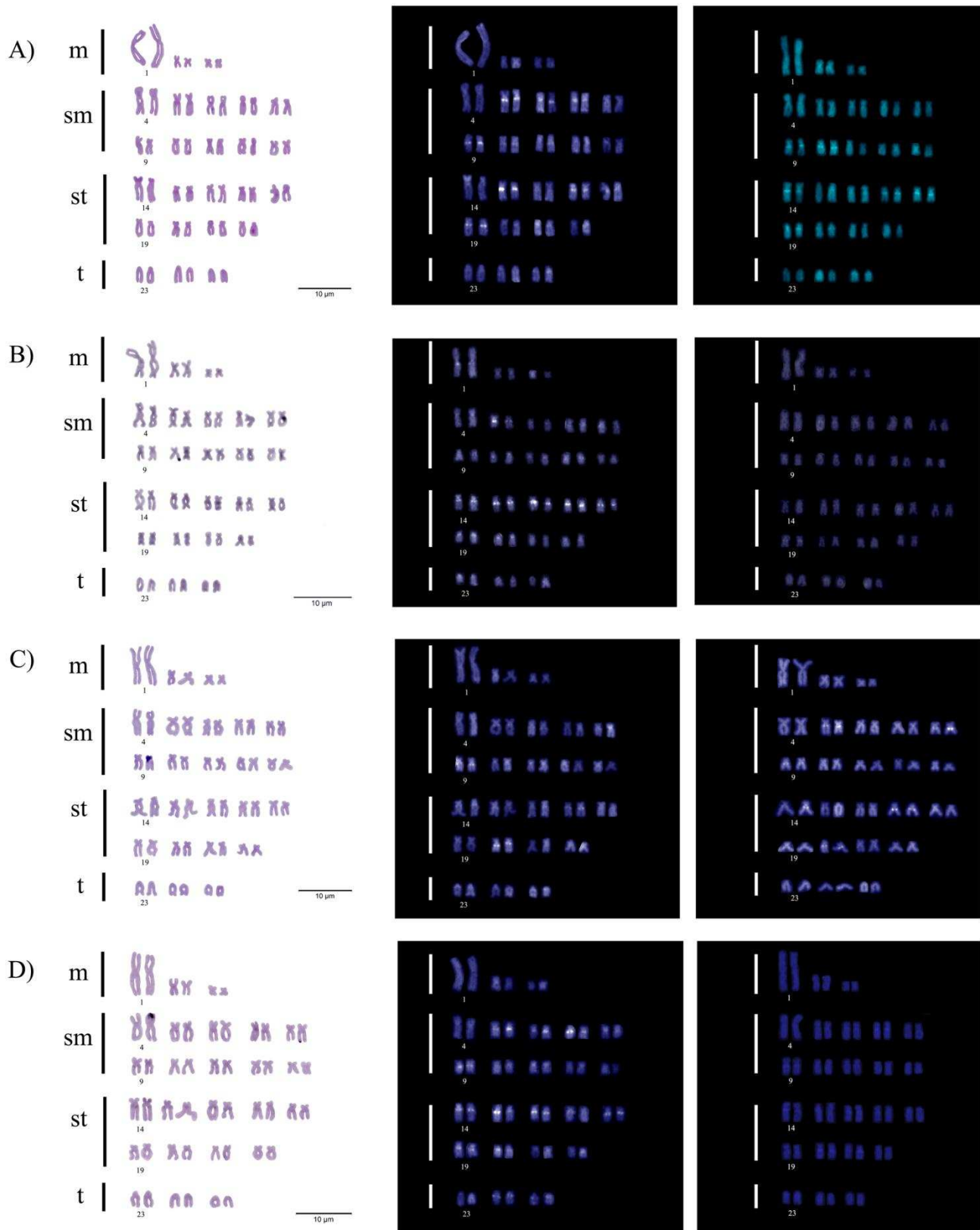
827

828

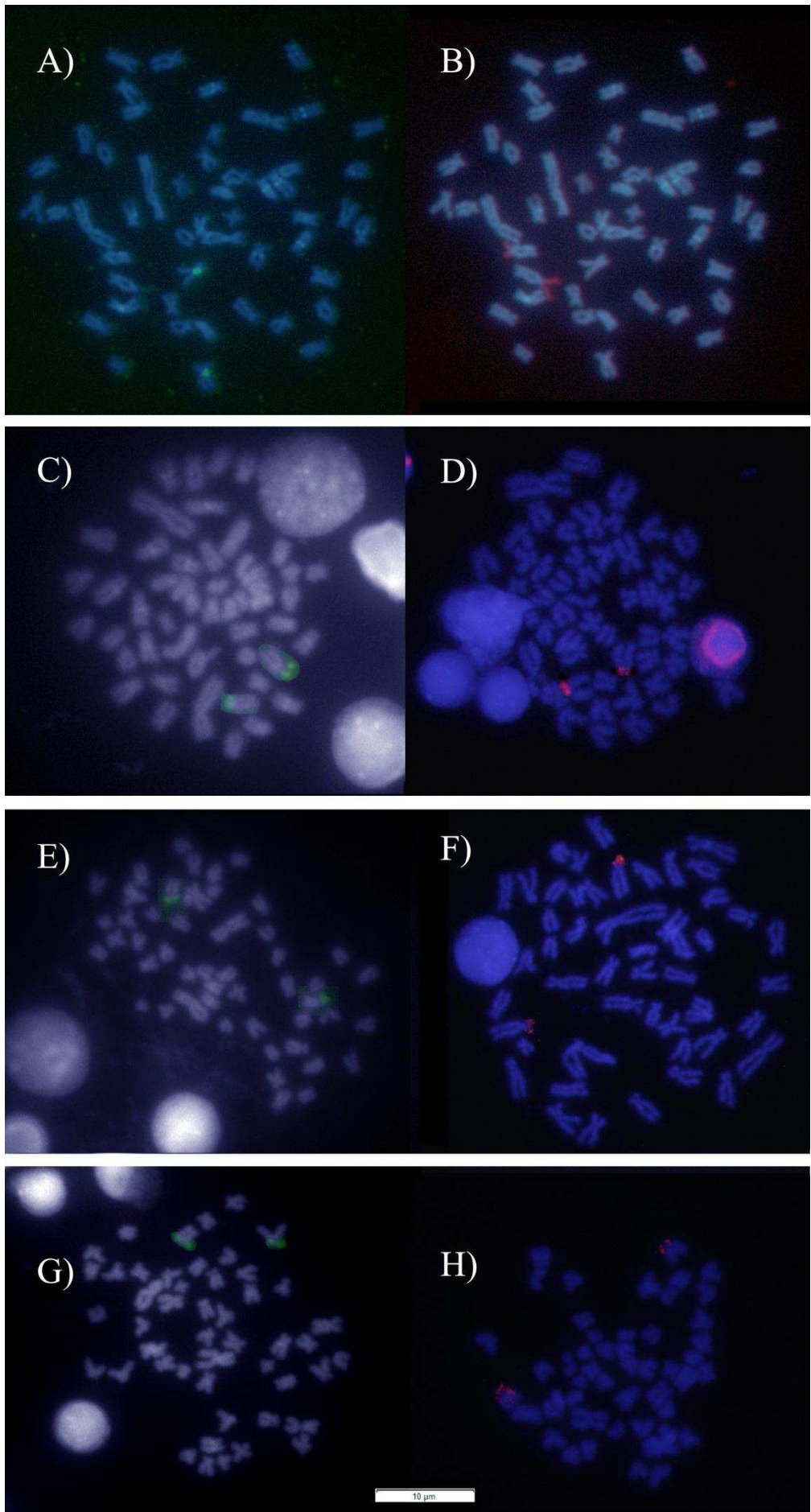
829

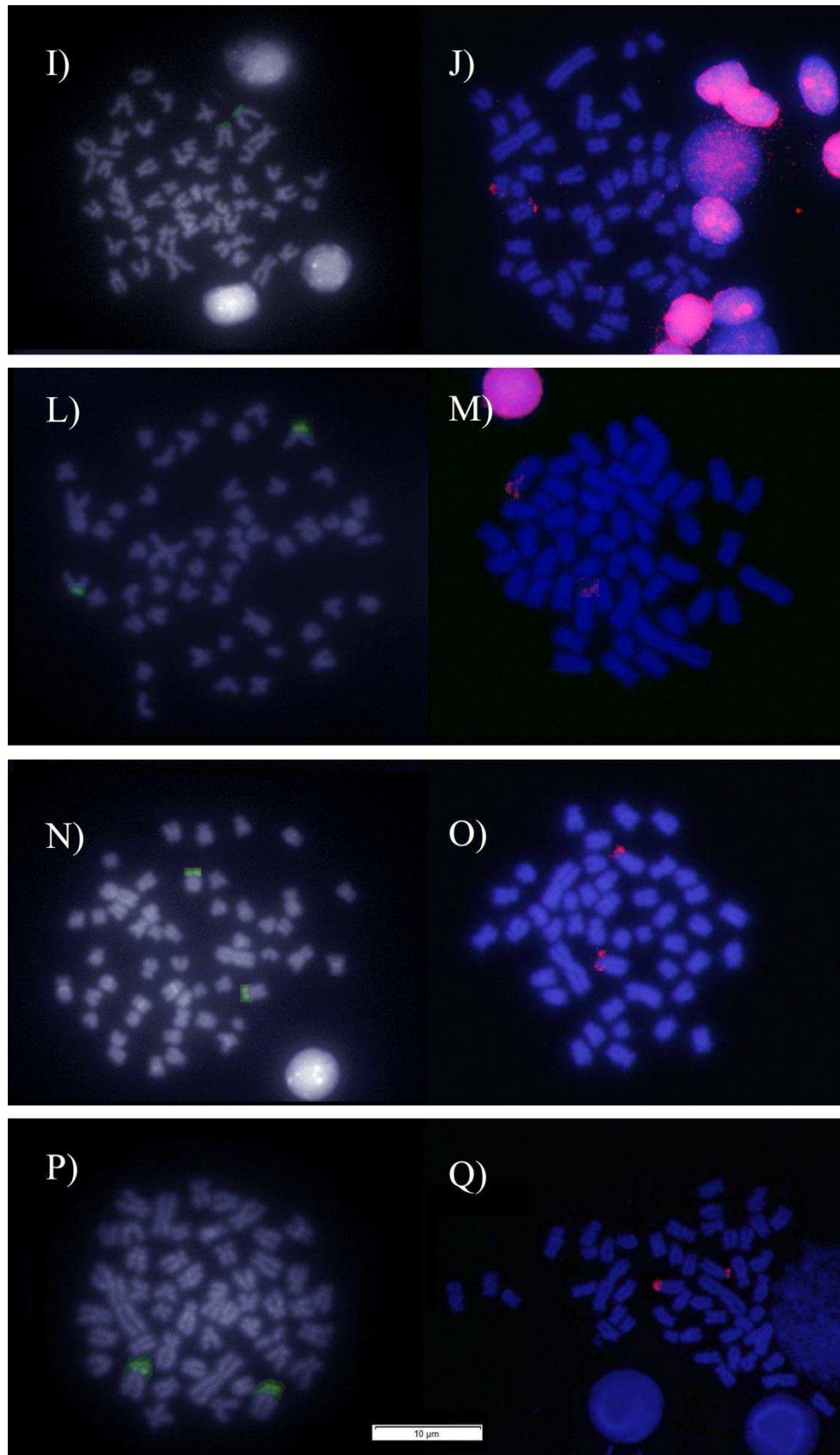
830

Figura 3 Padrões heterocromáticos obtidos com a banda C nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*: A) Córrego Espírito Santo; B) Rio Paraíba do Sul; C) Rio Carangola; D) Rio Piranga; E) Córrego São Bartolomeu; F) Lagoa Curi; G) Lagoa Juiz de Fora; H) Lagoa Marola; I) Lagoa Tiririca; J) Rio Mucuri; L) Rio São João.

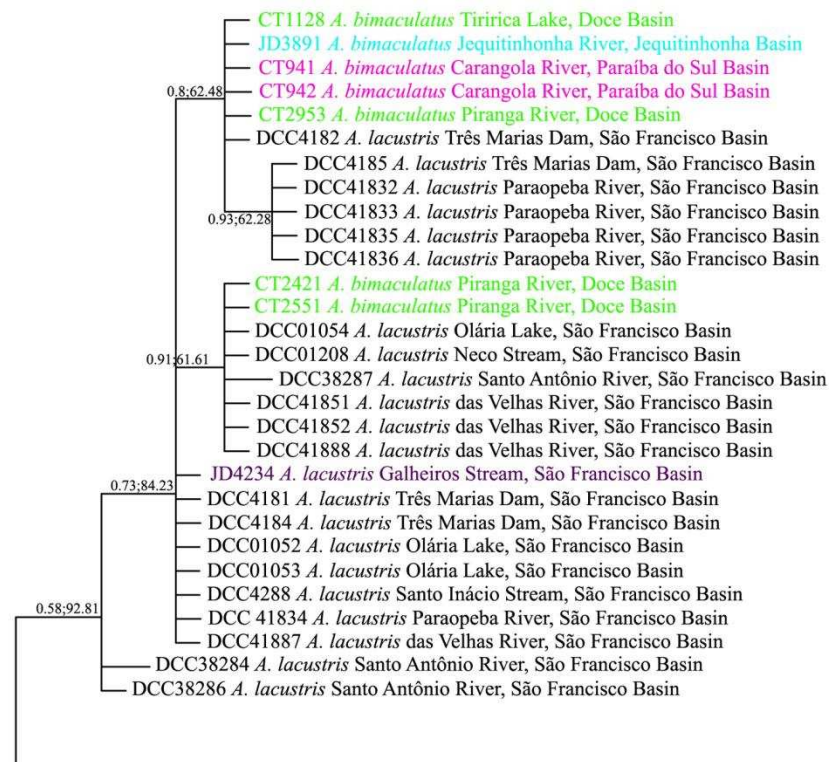


831
832 Figura 4 Padrões de banda C corados convencionalmente (coluna da esquerda) e
833 corados com o fluorescente DAPI (coluna central). Comparação com lâminas sem
834 bandeamento C coradas com DAPI (coluna da direita) nas populações de *Astyanax aff.*
835 *bimaculatus*: A) Córrego Espírito Santo; B) Rio Paraíba do Sul; C) Rio Piranga; D) Rio
836 Mucuri.



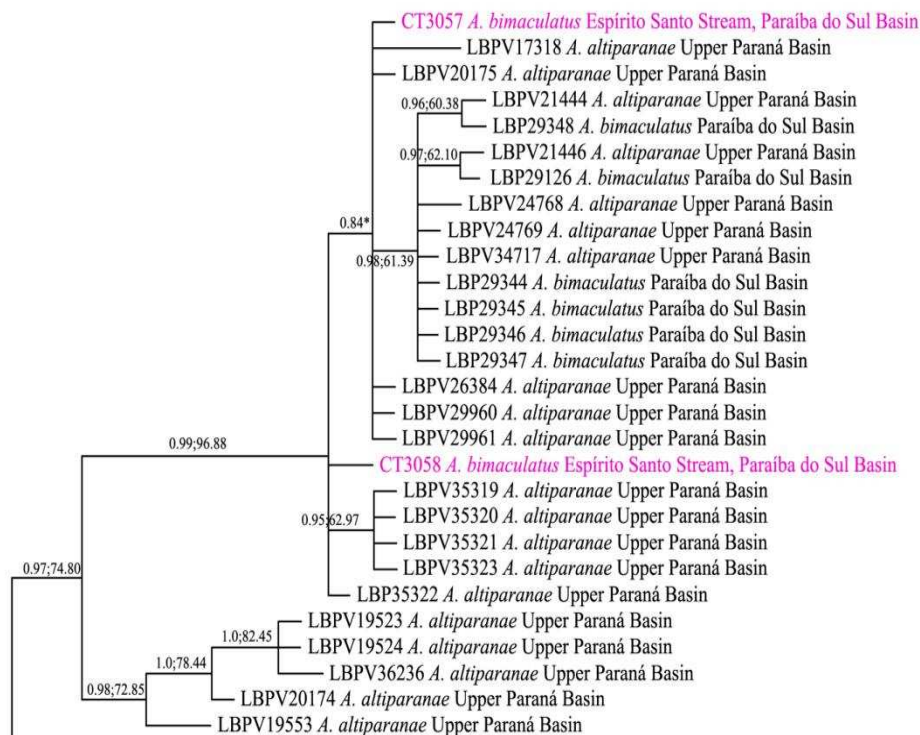


838
 839 Figura 5 Padrão de FISH 5S (sonda verde - coluna da esquerda) e 18S (sonda vermelha
 840 - coluna da direita) obtido nas populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*: A-B) Córrego
 841 Espírito Santo; C-D) Rio Paraíba do Sul; E-F) Rio Piranga; G-H) Córrego São
 842 Bartolomeu; I-J) Lagoa Curi; L-M) Lagoa Linguíça; N-O) Lagoa Tiririca; P-Q) Rio
 843 Mucuri.



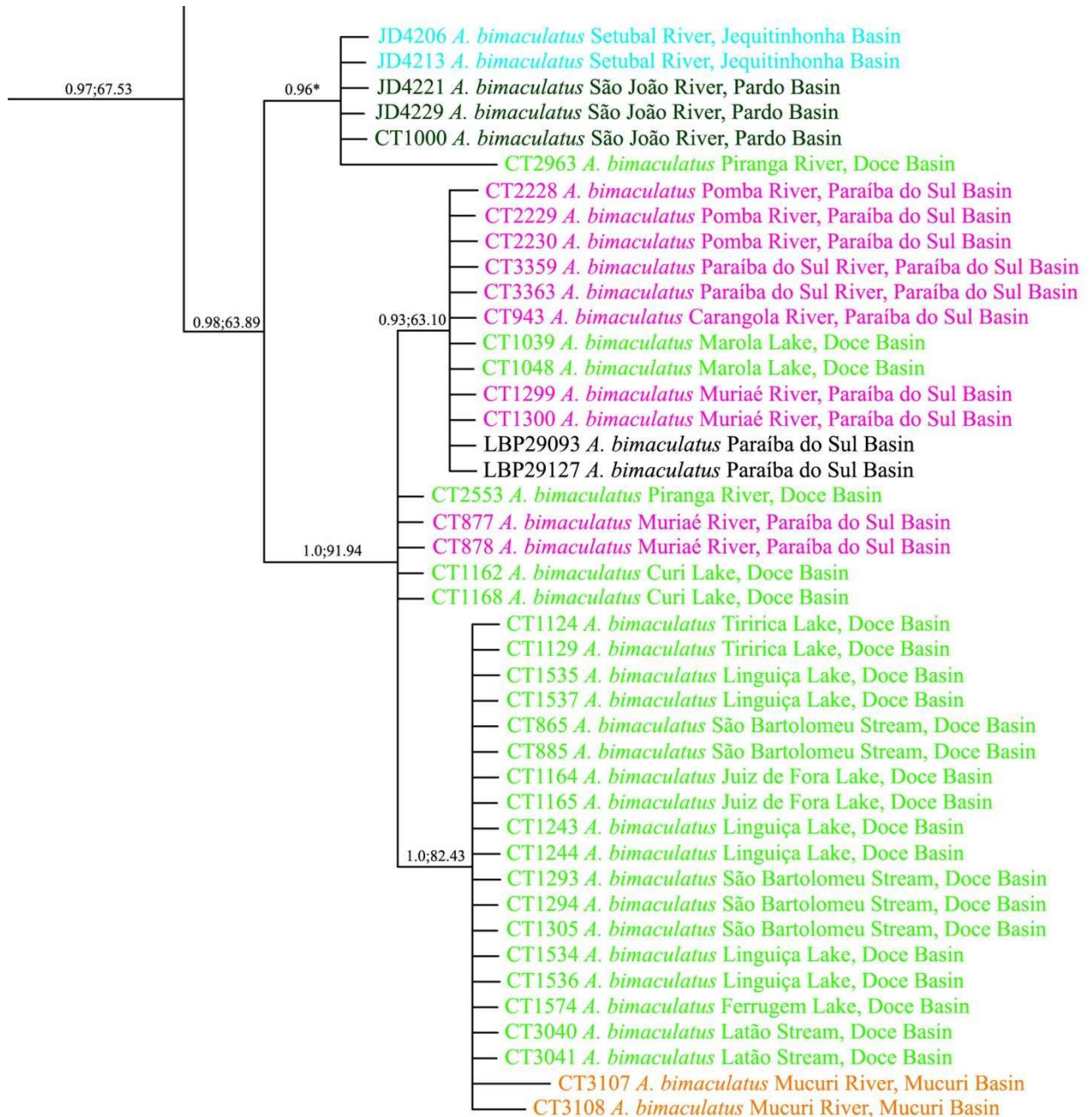
844

845 Figura 6 Filogenia do Haplogrupo I obtida com o gene COI das amostras sequenciadas
 846 das populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise
 847 Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (inferência
 848 bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente.

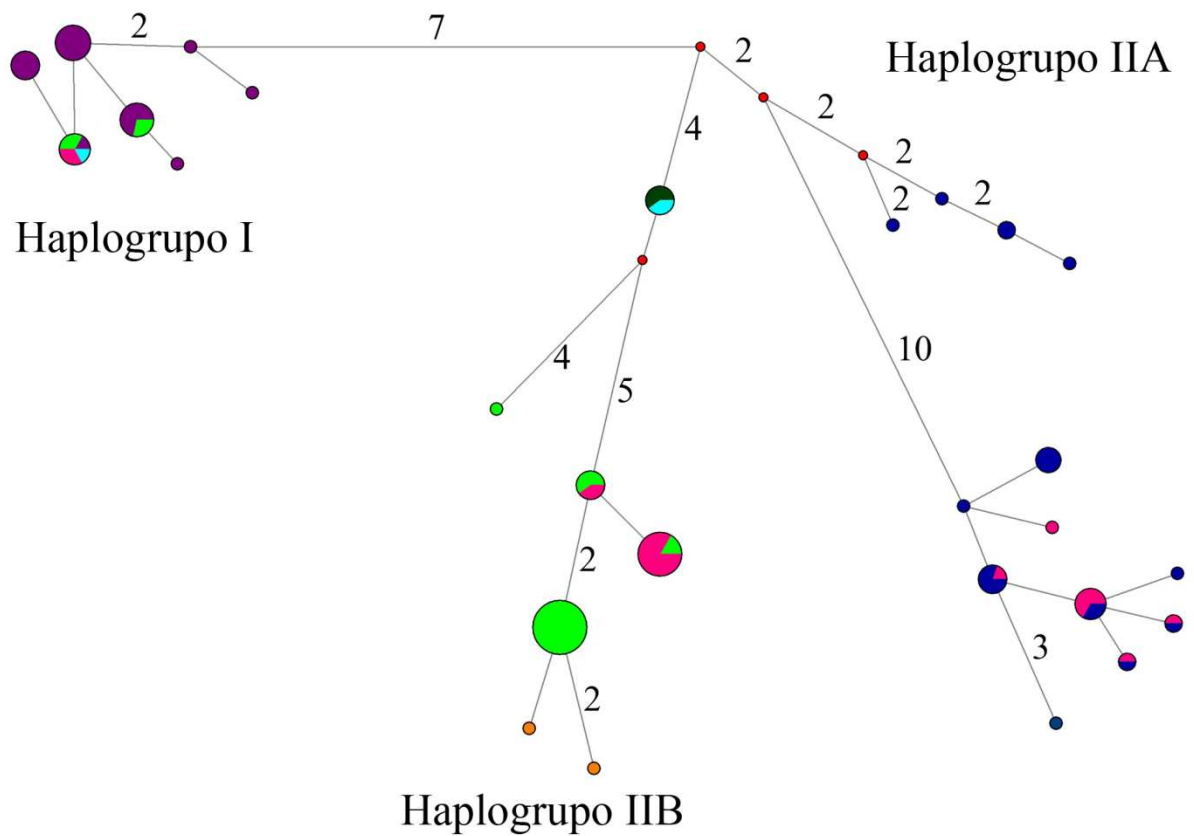


850

851 Figura 7 Filogenia do Haplogrupo IIA obtida com o gene COI das amostras
 852 sequenciadas das populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*. A topologia foi obtida
 853 através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade
 854 posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. * indica
 politomia.



857 Figura 8 Filogenia do Haplogrupo IIB obtida com o gene COI das amostras
 858 sequenciadas das populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. A topologia foi obtida
 859 através da Análise Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade
 860 posterior (inferência bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. * indica
 861 politomia.



8
863

864 Figura 9 Rede de haplótipos do gene COI gerada para as populações de *Astyanax* aff.
865 *bimaculatus*. As cores dos haplótipos correspondem à bacia hidrográfica de coleta:
866 Bacia do Rio São Francisco = roxo, Bacia do Rio Jequitinhonha = azul claro, Bacia do
867 Rio Pardo = verde escuro, Bacia do Rio Mucuri = laranja, Bacia do Rio Doce = verde
868 claro, Bacia do Rio Paraíba do Sul = rosa, Bacia do Alto Paraná = azul escuro. Os
869 valores nos ramos da rede de haplótipos representam o número de substituições
870 nucleotídicas (exceto quando foi observada apenas uma substituição). Os pontos
871 vermelhos indicam os haplótipos não amostrados e o tamanho dos círculos é
872 proporcional à frequência dos haplótipos.

873 Tabela I Locais de coleta e tamanho amostral das populações de *Astyanax aff.*

874 *bimaculatus*.

875

Bacia Hidrográfica	Local	GPS	Tamanho Amostral Citogenética/Molecular
Rio Paraíba do Sul	Córrego Espírito Santo	21°41'27.37"S 43°28'25.34"W	16/02
Rio Paraíba do Sul	Rio Pomba	21°31'45.30"S 42°38'06.48"W	00/03
Rio Paraíba do Sul	Rio Muriaé	21°31'48"S 42°38'23"W	00/04
Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	21°42'35"S 42°07'55"W	35/02
Rio Paraíba do Sul	Rio Carangola	20°42'12.14"S 42°02'18.10"W	13/02
Rio Doce	Rio Piranga	20°25'41.81"S 42°55'18.93"W	18/05
Rio Doce	Córrego São Bartolomeu	20°45'30.18"S 42°52'27.04"W	13/05
Rio Doce	Latão Stream	20°51'26"S 42°47'23"W	00/02
Rio Doce	Lagoa Curi	19°43'11.06"S 42°28'09.96"W	04/02
Rio Doce	Lagoa Ferrugem	19°36'38.8"S 42°27'25.6"W	00/01
Rio Doce	Lagoa Juiz de Fora	19°42'15.78"S 42°28'58.35"W	03/02
Rio Doce	Lagoa Linguíça	19°33'16.1"S 42°29'42.7"W	11/06
Rio Doce	Lagoa Marola	19°44'50.33"S 42°26'52.55"W	26/02
Rio Doce	Lagoa Tiririca	19°18'51.48"S 42°24'13.51"W	15/02
Rio Mucuri	Rio Mucuri	17°42'21.14"S 40°45'42.47"W	04/02
Rio Pardo	Rio São João	15°09'83.6"S 42°09'74.4"W	01/03
Rio Jequitinhonha	Rio Setúbal	17°04'55"S 42°15'10"W	00/02
Rio Jequitinhonha	Rio Jequitinhonha	16°17'17"S 40°48'43"W	00/01
Rio São Francisco *	Córrego Galheiros	15°02'57"S 42°56'48"W	00/01

876 *Conhecido como *Astyanax lacustris*.

Espécie	Local – Bacia Hidrográfica	2n	Tipos Cromossômicos				Referência	
			m	sm	st	t		
<i>A. altiparanae</i>	Rio Meia Ponte, Bacia do Rio Paranaíba	50	-	26	-	24	Jin & Toledo, 1975	
	Rio Mogi-Guaçu, Bacia do Alto Paraná	50	10	24	4	12	Morelli et al., 1983	
	Rio Claro, Bacia do Rio Paranapanema	50	10	26	4	10	Pacheco et al., 2001	
			50	10	24	4	12	
			50	10	22	4	14	
	Rio Paranapanema, Bacia do Alto Paraná	50	10	22	6	12	Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001	
	Rio Mogi-Guaçu, Bacia do Alto Paraná	50	32m+sm		18st+t		Almeida-Toledo et al., 2002	
	Rio Índios, Bacia do Rio Ivaí	50	6	30	4	10	Fernandes & Martins Santos, 2004	
	Rio Paraná, Bacia do Alto Paraná	50	6	26	6	12		
	Rio Paraná, Bacia do Alto Paraná	50	6	26	6	12	Fernandes & Martins Santos, 2006	
	Córrego Tatupeba, Bacia do Alto Paraná	50	6	26	6	12		
	Córrego Keçaba, Bacia do Alto Paraná	50	6	26	6	12		
	Córrego Maringá, Bacia do Alto Paraná	50	6	26	6	12		
	Lagoa Tarumã, Bacia do Rio Tibagi	50	6	28	8	8	Domingues et al., 2007	
	Rio Iraí, Bacia do Rio Iguaçu	50	6	30	8	6		
	Rio Paraitinga, Bacia do Rio Tietê	50	8	20	10	12	Kavalco et al., 2011	
	Pilar do Sul, Bacia do Rio Paranapanema	50	8	22	14	6		
	Córrego Monjolinho, Bacia do Alto Paraná	50	8	20	12	10	Peres et al., 2008	
	Rio Jordão, Bacia do Rio Iguaçu	50	6	28	8	8	Ferreira-Neto et al., 2009	
	Córrego Feijão, Bacia do Rio Mogi-Guaçu	50	6	30	8	6		
	Córrego Pântano, Bacia do Rio Tietê	50	6	28	4	12		
	Rio Mogi-Guaçu, Bacia do Alto Paraná	50	6	12	20	12	Martinez et al., 2012	
	Rio Tietê, Bacia do Rio Tietê	50	6	12	20	12		
	Rio Batalha, Bacia do Alto Paraná	50	10	16	16	8	Hashimoto et al., 2011	
	Córrego Monjolinho, Bacia do Alto Paraná	50	6	18	20	6	Tenório et al., 2013	

	Córrego Água dos Patos, Bacia do Alto Paraná	50	8	24	6	12	Pacheco et al., 2011
	Lagoa Igapó, Bacia do Alto Paraná	50	8	28	4	10	
<i>A. argyrimarginatus</i>	Córrego Jaraguá, Bacia Tocantins-Araguaia	50	6	16	20	8	Tenório et al., 2013
<i>A. bimaculatus</i>	Sete Barras, Bacia do Rio Ribeira de Iguape	50	8	24	12	6	Kavalco et al., 2011
	Cachoeiras de Macacu, Rio Guapimirim	50	8	24	12	6	
	Rio Contas, Bacia do Rio Contas	50	6	28	12	4	Pamponet et al., 2008
	Córrego Mineiro, Bacia Recôncavo Sul	50	6	28	12	4	
	Córrego Espírito Santo, Rio Paraíba do Sul	50	6	20	18	6	Presente estudo
	Rio Paraíba do Sul, Rio Paraíba do Sul	50	6	20	18	6	
	Rio Carangola, Rio Paraíba do Sul	50	6	20	18	6	
	Rio Piranga, Rio Doce	50	6	20	18	6	
	Córrego São Bartolomeu, Rio Doce	50	6	20	18	6	
	Lagoa Curi, Rio Doce	50	6	20	18	6	
	Lagoa Juiz de Fora, Rio Doce	50	6	20	18	6	
	Lagoa Marola, Rio Doce	50	6	20	18	6	
	Rio Mucuri, Bacia do Rio Mucuri	50	6	20	18	6	
	Rio São João, Bacia do Rio Pardo	50	6	20	18	6	
	Córrego Dois de Agosto, Tocantins-Araguaia	50	4	14	24	8	Tenório et al., 2013
<i>A. goyacensis</i>	Córrego Taboquinha, Bacia Tocantins-Araguaia	50*	8	26	8	8	Santos et al., 2013
<i>A. jacuhiensis</i>	Rio Maquiné, Bacia do Rio Tramandaí	50	10	26	6	8	Silva et al., 2012
	Lagoa Quadros, Bacia do Rio Tramandaí	50	12	20	6	12	
	Lago Guaíba, Rio Grande do Sul	50	8	30	4	8	Pacheco et al., 2010
<i>A. lacustris</i>	Represa Três Marias, Bacia do rio São Francisco	50	8	20	16	6	Peres et al., 2008
	Bacia do Rio São Francisco	50	32m+sm		18st+t		Almeida-Toledo et al., 2002

* Foram observados de um a nove microcromossomos em *Astyanax goyacensis*.

Atualizado a partir de Kavalco et al., 2011

878 Tabela III Variação no número e localização de NORs nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.

879

Espécie	Bacia Hidrográfica	Local	Número de NORs	Localização das NORs	Referências
<i>A. altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	Córrego Monjolinho	2	-	Peres et al., 2008
	Bacia do Alto Paraná	Rio Mogi-Guaçu	1 até 5	-	Morelli et al., 1983
	Bacia do Alto Paraná	-	3	-	Almeida-Toledo et al., 2002
	Rio Paranapanema	Rio Claro	1 até 4	-	Pacheco et al., 2001
	Bacia do Alto Paraná	Rio Índios	1 até 10	2+8+10+19+20	Fernandes & Martins Santos, 2004
	Bacia do Alto Paraná	Rio Paraná	2	20	
	Rio Tibagi	Lagoa Tarumã	4	-	Domingues et al., 2007
	Rio Iguazu	Rio Iraí	2	-	
	Bacia do Rio Tietê	Rio Paraitinga	2	-	Kavalco et al., 2011
	Rio Paranapanema	Pilar do Sul	2	-	
	Rio Pardo	Rio Jordão	2-4	-	Ferreira-Neto et al., 2009
	Rio Mogi-Guaçu	Córrego do Feijão	1-3	-	
	Bacia do Rio Tietê	Córrego Pântano	1-2	-	
	Bacia do Alto Paraná	Rio Mogi-Guaçu	2	11	Martinez et al., 2012
	Bacia do Rio Tietê	Rio Tietê	2	11	
	Bacia do Alto Paraná	Córrego Monjolinho	4	-	Tenório et al., 2013
	Bacia do Alto Paraná	Córrego Água dos Patos	2 até 4	-	Pacheco et al., 2011
	Bacia do Alto Paraná	Lagoa Igapó	1 até 3	-	
<i>A. argyrimarginatus</i>	Tocantins-Araguaia	Córrego Jaraguá	2	-	Tenório et al., 2013
<i>A. bimaculatus</i>	Rio Paraíba do Sul	Córrego Espírito Santo	2 até 8	4+5+6+15+19	Presente estudo
	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	2	14	
	Rio Paraíba do Sul	Rio Carangola	2	14	

	Rio Doce	Rio Piranga	2 ou 3	14+15	
	Rio Doce	Córrego São Bartolomeu	2	14	
	Rio Doce	Lagoa Curi	2	14	
	Rio Doce	Lagoa Juiz de Fora	2	14	
	Rio Doce	Lagoa Marola	2	14	
	Rio Doce	Lagoa Tiririca	2	14	
	Rio Mucuri	Rio Mucuri	2 ou 3	05+14	
	Rio Pardo	Rio São João	2	14	
	Rio Contas	Rio Contas	1 até 4	-	Pamponet et al., 2008
	Córrego Mineiro	Recôncavo Sul	1 até 4	-	
	Sete Barras	Rio Ribeira de Iguape	2	-	Kavalco et al., 2011
	Cachoeiras de Macacu	Rio Guapimirim	2	-	
	Córrego Dois de Agosto	Bacia Tocantins-Araguaia	2	-	Tenório et al., 2013
<i>A. goyacensis</i>	Córrego Taboquinha	Bacia Tocantins-Araguaia	3 até 4	-	Santos et al., 2013
<i>A. jacuhiensis</i>	Rio Maquiné	Bacia do Rio Tramandaí	2	-	Silva et al., 2012
	Lagoa Quadros	Bacia do Rio Tramandaí	2	-	
	Lagoa Guaíba	Rio Grande do Sul	2 até 5	4+8+20	Pacheco et al., 2010
<i>A. lacustris</i>	Rio São Francisco	Represa Três Marias	2	-	Peres et al., 2008
	Rio São Francisco	-	2	-	Almeida-Toledo et al., 2002

881 Tabela IV Padrões heterocromáticos obtidos através da banda C nas populações de *Astyanax aff. bimaculatus*.

	Córrego Espírito Santo	Paraíba do Sul	Rio Carangola	Rio Piranga	Córrego São Bartolomeu	Lagoa Curi	Lagoa Juiz de Fora	Lagoa Marola	Lagoa Tiririca	Rio Mucuri	Rio São João
Pair 1	-	peric	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pair 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	centro	-
Pair 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	centro
Pair 4	-	-	-	-	centro	-	-	-	-	-	-
Pair 5	peric	peric	-	peric	peric	peric	peric	-	peric	peric	peric
Pair 6	peric	centro	Centro	peric	peric	peric	-	-	peric	peric	peric
Pair 7	peric	centro	Centro	-	-	-	peric	peric	peric	peric	peric
Pair 8	-	-	Centro	-	-	-	centro	-	-	-	peric
Pair 9	peric	-	-	peric	peric	-	-	-	-	peric	peric
Pair 10	peric	centro	Peric	centro	peric	peric	centro	-	-	-	centro
Pair 11	peric	-	Peric	centro	-	peric	-	-	centro	centro	centro
Pair 12	-	centro	Peric	-	centro	centro	-	peric	centro	-	-
Pair 13	-	-	Peric	-	-	-	-	-	-	-	-
Pair 14	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric*	peric
Pair 15	peric	peric	Peric	-	-	peric	peric	peric	peric	peric	peric
Pair 16	-	peric	Peric	-	-	peric	peric	centro	centro	peric	peric
Pair 17	peric	peric	-	peric	peric	-	peric	-	centro	-	peric
Pair 18	peric	peric	Peric	-	-	-	-	-	peric	peric	peric
Pair 19	peric	peric	Peric	-	peric	peric	peric	peric	peric	peric	centro
Pair 20	-	centro	Peric	peric	peric	peric	peric	peric	-	centro	peric
Pair 21	-	-	-	-	peric	-	-	-	-	-	peric
Pair 22	-	-	-	-	peric	-	-	-	-	-	-
Pair 23	-	centro	Peric	peric	peric	centro	centro	-	centro	peric	peric
Pair 24	-	centro	-	-	peric	-	-	-	-	peric	peric
Pair 25	peric	-	-	-	-	-	-	centro	-	peric	peric

882 Legenda: na tabela “centro” significa marcação centromérica e “peri” significa marcação pericentromérica. * indica o par que contém a NOR.

883 Tabela V Distância molecular dentro e entre haplogrupos obtida com as sequências do
 884 gene COI no complexo *Astyanax aff. bimaculatus*.

885

	Haplogrupo I	Haplogrupo IIA	Haplogrupo IIB
Haplogrupo I	0,0027		
Haplogrupo IIA	0,0371	0,0105	
Haplogrupo IIB	0,0281	0,0314	0,0053

886

887 Valores abaixo da diagonal representam as distâncias entre os haplogrupos. Valores nas
 888 diagonais representam as distâncias dentro dos haplogrupos.

889

890

891 Apêndice I Sequências do gene COI obtidas no GenBank das espécies *Astyanax*
 892 *altiparanae*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax lacustris*, e dos grupos externos *Astyanax*
 893 *fasciatus* e *Piabina argentea*.

894

Espécie	Local	Número de Acesso no GenBank
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-17318
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-19523
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-19524
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV -19553
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-20174
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-20175
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-21444
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-21446
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-24768
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-24769
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-26384
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-29960
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-29961
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-34717
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-35319
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-35320

<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-35321
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-35322
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-35323
<i>Astyanax altiparanae</i>	Bacia do Alto Paraná	LBPV-36236
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29093
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29126
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29127
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29344
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29345
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29346
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29347
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Bacia do Rio Paraíba do Sul	LBP-29348
<i>Astyanax lacustris</i>	Lagoa Olária, Bacia São Francisco	DCC01052
<i>Astyanax lacustris</i>	Lagoa Olária, Bacia São Francisco	DCC01053
<i>Astyanax lacustris</i>	Lagoa Olária, Bacia São Francisco	DCC01054
<i>Astyanax lacustris</i>	Córrego Neco, Bacia São Francisco	DCC01208
<i>Astyanax lacustris</i>	Córrego Santo Inácio, Bacia São Francisco	DCC4288
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Santo Antônio, Bacia São Francisco	DCC38284
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Santo Antônio, Bacia São Francisco	DCC38286
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Santo Antônio, Bacia São Francisco	DCC38287
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Paraopeba, Bacia São Francisco	DCC41832
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Paraopeba, Bacia São Francisco	DCC41833
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Paraopeba, Bacia São Francisco	DCC41834
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Paraopeba, Bacia São Francisco	DCC41835
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio Paraopeba, Bacia São Francisco	DCC41836
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio das Velhas, Bacia São Francisco	DCC41851
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio das Velhas, Bacia São Francisco	DCC41852
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio das Velhas, Bacia São Francisco	DCC41887
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio das Velhas, Bacia São Francisco	DCC41888
<i>Astyanax lacustris</i>	Represa Três Marias, Bacia São Francisco	DCC4181
<i>Astyanax lacustris</i>	Represa Três Marias, Bacia São Francisco	DCC4182
<i>Astyanax lacustris</i>	Represa Três Marias, Bacia São Francisco	DCC4184
<i>Astyanax lacustris</i>	Represa Três Marias, Bacia São Francisco	DCC4185
<i>Astyanax fasciatus</i>	Bacia do Alto Paraná	HRCB44570

Piabina argentea	Bacia do Alto Paraná	LBP-17227
Piabina argentea	Bacia do Alto Paraná	LBP-20764

895

896

897 Apêndice II Filogenia obtida com o gene COI das amostras sequenciadas das
898 populações de *Astyanax aff. bimaculatus*. A topologia foi obtida através da Análise
899 Bayesiana. Suporte estatístico foi obtido através de probabilidade posterior (ingerência
900 bayesiana) e bootstrap (parcimônia), respectivamente. *indica politomia. Barra indica
901 distância molecular obtida através da análise bayesiana. (Disponível apenas online). As
902 cores são as mesmas apresentadas na rede de haplótipos.