

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA



Análise filogeográfica de *Astyanax altiparanae* Garutti
& Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) da bacia do
Alto rio Paraná no estado de São Paulo.



Gabriela Zanon Pelicão-Dardis



Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área: Biologia Comparada.



RIBEIRÃO PRETO – SP



2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

**Análise filogeográfica de *Astyanax altiparanae* Garutti
& Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) da bacia do
Alto rio Paraná no estado de São Paulo.**

Gabriela Zanon Pelição-Dardis

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Corrêa e Castro

**Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Biologia Comparada.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2006

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pelição-Dardis, Gabriela Zanon

Análise filogeográfica de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) da bacia do Alto rio Paraná no estado de São Paulo.

Ribeirão Preto, 2006

134 p. : il.; 30cm

Tese, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Biologia.

Orientador: Castro, Ricardo Macedo Corrêa e

1. *Astyanax altiparanae*
2. Filogeografia
3. DNA mitocondrial

“Não sou insensível à beleza natural, mas minhas alegrias emocionais estão centradas nas obras improváveis e, todavia às vezes maravilhosas, desse minúsculo e acidental ramo evolutivo chamado Homo sapiens. E, entre essas obras, não há nada mais nobre do que a história de nossos esforços para entender a natureza...”

Stephen Jay Gould

Viva o Brontossauro: Reflexões sobre História Natural
Companhia das Letras, 1991

Agradeço aqui às pessoas e Instituições que foram importantes para a realização deste trabalho:

Prof. Dr. Ricardo M. C. Castro, pela sua orientação, sugestão do tema a ser estudado, e por tudo que aprendi durante os anos de convivência.

Profa. Dra. Maura Helena Manfrin, pela sua co-orientação, por ter me proporcionado as melhores condições para a realização deste trabalho em seu laboratório, e pela sua disponibilidade para ajudar em tudo que precisei.

Prof. Dr. Reinaldo A. de Brito, pela sua imprescindível ajuda com as análises populacionais.

Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, pela grande ajuda no desenho dos “primers”.

Prof. Dr. Flávio Alicino Bockmann, pelas pertinentes críticas e sugestões a este trabalho, feitas na condição de assessor científico do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, e também por toda a ajuda prestada.

Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, pela enriquecedora convivência no Laboratório de Genética Evolutiva.

Prof. Dr. Mário de Vivo, pelas interessantes discussões biogeográficas.

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, chefe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas–FFCLRP-USP, e a aluna Andréa Carla Quiapin, pelo uso de equipamentos e auxílio no seqüenciamento do DNA.

Prof. Dr. Wilson da Silva Junior, chefe do Laboratório de Genética Molecular e Bio-Informática - Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, e a técnica Camila, também pelo uso de equipamentos e auxílio no seqüenciamento do DNA.

Profa. Dra. Zilá Luz Paulino-Simões e Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, por terem permitido o uso de equipamentos do seu Laboratório.

Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi, também por ter permitido o uso de equipamentos do seu Laboratório.

Os amigos Hertz Figueiredo dos Santos, Murilo de Carvalho e Ricardo Cardoso Benine, pela ajuda nas coletas.

Toda a equipe do Projeto Temático “Diversidade de Peixes de Riachos e Cabeceiras da Bacia do Alto Rio Paraná no Estado de São Paulo”, vinculado ao Programa BIOTA/FAPESP (processo n.º 98/05072-8), pela coleta do material biológico utilizado neste trabalho.

Adriana Coletto Morales, por sua valiosa ajuda durante todas as etapas da realização deste trabalho.

Os amigos do Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto: Katiane M. Ferreira, Alexandre C. Ribeiro, Murilo de Carvalho, Aléssio Datovo, Adriana Takako, Vítor Masson, Micheli Beccari, Murilo de Carvalho, Marcelo de Carvalho, Marcel Cavallaro, Tatiana X. de Abreu, Fernando Z. Gibran, Ricardo C. Benine, e a funcionária Cláudia Moço; e os amigos do Laboratório de Genética Evolutiva: Adriana C. Morales, Fernando F. Franco, Érica C. C. Silva, André Luiz Esguícero, Andressa Manami, Pedro Roberto Prado, e Gustavo Kuhn, pela prazerosa convivência.

O funcionário do Laboratório de Genética Evolutiva, Paulo Ricardo Epifânio, pelo seu cuidado com o material de bancada.

O Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, e o Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, um grande privilégio estudar aqui.

Prof. Dr. John Campbell McNamara, coordenador do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, grande responsável pelo sucesso e crescimento dessa Pós-Graduação.

Renata Andrade Cavalari, secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, pela sua competência e disponibilidade em resolver questões burocráticas.

O Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela utilização do espaço físico e equipamentos.

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio financeiro (Processo 01/00780-9), e o assessor científico anônimo por ela designado, pela atenção que dedicou a este trabalho.

E por fim, gostaria de agradecer ao meu marido André, aos meus pais, Luiz e Maria Aparecida, ao meu irmão Thiago, e à minha madrinha Anna Luiza, as pessoas mais importantes da minha vida, por todo apoio e incentivo.

Resumo

Pelição-Dardis, G. Z. **Análise filogeográfica de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) da bacia do Alto rio Paraná no estado de São Paulo.** 2006, 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Peixes de água doce fornecem um elo natural entre a evolução biótica e geológica de uma área, devido à dispersão destes dependerem diretamente das conexões entre bacias. Do ponto de vista zoogeográfico, os mais importantes são os da divisão primária, que estiveram durante toda a sua história evolutiva confinados às águas doces. Estes estão confinados a determinadas bacias e dispersam-se de forma limitada tanto devido às barreiras físicas, quanto as diferentes capacidades natatórias entre as espécies, preservando antigos padrões de distribuição geográfica. Assim, a presença de espécies caracterizadas pela capacidade de deslocamento relativamente limitada em riachos e cabeceiras, deve facilitar a ocorrência de eventos vicariantes, podendo levar a multiplicação por especiação em isolamento geográfico. Para testar essa hipótese, foram analisados 175 indivíduos de *Astyanax altiparanae* provenientes de 36 populações de riachos e cabeceiras da bacia do Alto rio Paraná, no estado de São Paulo, visando identificar se existe estruturação genética entre essas populações; qual o padrão filogenético intra-populacional atual, e os processos evolutivos que o causou, já que a quantidade e distribuição da variação genética intraespecífica é consequência tanto de sua estrutura populacional atual, como de eventos históricos. Foram utilizadas seqüências de parte do gene mitocondrial Citocromo B (805 pb) para testar as relações entre a variação haplotípica e a distribuição geográfica - Filogeografia - de acordo com a análise de agrupamento de clados não enraizado (NCA), através do programa computacional Geodis v. 2.4. A análise da estrutura populacional foi obtida também através da análise da variância molecular (AMOVA) realizada com o auxílio do programa computacional Arlequin v. 3.0, e da análise da “Mismatch distribution”, realizada através do programa DnaSP v. 4.10. Os resultados da NCA mostraram que fluxo gênico restrito pela distância é responsável pelo padrão atual de distribuição de *A. altiparanae* nas populações analisadas. Os resultados da AMOVA constataram que a maior proporção da variabilidade genética é encontrada dentro das populações, que estão estruturadas geneticamente sob o modelo do fluxo gênico restrito pela distância, não estando estruturadas em sub-bacias, e que provavelmente não existam barreiras geográficas, tampouco ecológicas, ao fluxo gênico entre as populações, incluindo àquelas localizadas nos rios principais desta bacia. A distância geográfica entre as populações parece ser o único fator limitante ao fluxo gênico, devido principalmente ao pequeno porte de *A. altiparanae*. Este resultado sugere que o tamanho reduzido das espécies de peixes de riachos provavelmente seja o principal fator limitante à dispersão destas espécies, o que está de acordo com a hipótese de Castro (1999), de que a capacidade de deslocamento relativamente baixa e limitada das espécies de pequeno porte, que restringe as suas distribuições geográficas, poderia facilitar a separação geográfica de populações, e desta forma favorecer o surgimento de novas espécies devido ao isolamento geográfico.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*, filogeografia, citocromo b mitocondrial.

Abstract

Pelição-Dardis, G. Z. **Phylogeographic analysis of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) from the upper Rio Paraná basin in the state of São Paulo.** 2006, 134 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Freshwater fishes provide a natural link between the geologic and biotic evolution of an area, due to their dispersion be directly dependent on the connections among basins. From the zoogeographical point of view, the most important ones are that of the primary division that has been, during their entire evolutionary history, confined to freshwaters. They are confined to determined basins and their dispersion capacity is limited due to the physical barriers, as well as the different natatoriums capacities between the species, preserving old geographic distribution patterns. Thus, the presence of species characterized by the relatively limited dispersion capacity in streams and headwaters should facilitate the occurrence of vicariant events, taking to the multiplication for speciation in geographic isolation. To test this hypothesis, 175 individuals of *Astyanax altiparanae* proceeding from 36 streams and headwaters populations from the upper Rio Paraná basin in the state of São Paulo were analyzed. The main goal was to identify if there is some genetic structuring between these populations; which is the current intra-population phylogenetic pattern, and the evolutive processes that caused it. Sequences of part of the mitochondrial Citocromo B gene were used (805 pb) to test the relation between the haplotipic variation and the geographic variation - Phylogeography –in agreement with the Nested Clade Analysis (NCA), through the computer program Geodis v. 2.4. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) through the computer program Arlequin v. 3.0, and the analysis of the “Mismatch distribution”, through the computer program DnaSP v. 4.10, performed the analysis of the structuring population. The result of the NCA showed that the gene flow restricted by distance is responsible for the current distribution pattern of *A. altiparanae* in the analyzed populations. The results of AMOVA evidenced that the largest ratio of the genetic variability is found inside of the populations, which are genetically structured under the model of gene flow restricted by distance. The populations are not structured in sub-basins, and probably there are no geographic barriers, neither ecological, to the gene flow between them, including those located in the main rivers of this basin. The geographic distance between populations seems to be the only factor that limits the gene flow, due mainly to the small size of *A. altiparanae*. This result suggests that the reduced size of stream fishes probably is the main factor that limits the dispersion of these species, which is in agreement with the Castro's hypothesis (1999), which relates the relatively low and limited displacement capacity of the small size species, with their restricted geographic distributions, that could facilitate the geographic separation of populations, and in certain way, favor the appearance of new species due to the geographic isolation.

Key-words: *Astyanax altiparanae*, phylogeography, mitochondrial citocromo b gene.

Sumário

1	Introdução	
1.1	- Filogeografia	1
1.2	- A Filogeografia e a ictiologia neotropical de água doce	18
1.3	- A bacia do Alto rio Paraná e <i>Astyanax altiparanae</i>	23
1.4	- Objetivos	31
2	Material & Métodos	
2.1	Indivíduos e populações amostradas	32
2.2	Preparação e seqüenciamento do DNA	34
2.3	Análises	44
3	Resultados	
3.1	Estatística descritiva	53
3.2	Haplótipos	53
3.3	Análise filogeográfica	55
3.4	Análise da variância molecular (AMOVA)	85
3.5	Testes de neutralidade	88
4	Discussão	89
5	Conclusões	101
6	Referências Bibliográficas	103
7	Anexo: Alinhamento das seqüências	113

1 Introdução

1.1 Filogeografia

A diversidade biológica é um dos aspectos mais espetaculares da natureza, e entender os mecanismos e processos que a geram têm sido um dos maiores desafios da Biologia Evolutiva. A evolução é freqüentemente considerada em dois domínios: micro-evolução e macro-evolução (Hendry & Kinnison, 2001). Mayr (1942) define micro-evolução como o processo evolutivo que ocorre em curtos espaços de tempo e em categorias sistemáticas mais basais, em geral, dentro de espécies, e macro-evolução como o desenvolvimento de um sistema orgânico novo, ou seja, o processo evolutivo que requer longos períodos de tempo e afeta as categorias sistemáticas mais altas.

Dois campos de estudo dentro da Biologia Evolutiva lidam com esses dois domínios, a Sistemática e a Genética de Populações. A Sistemática tenta determinar os padrões macro-evolutivos buscando as relações ancestral-descendente. A Genética de Populações procura inferir os processos micro-evolutivos pelos quais surgem e se estabelecem as variações intra-específicas herdáveis, sobre as quais atuam os mecanismos evolutivos. (Eldredge & Cracraft, 1980; Avise et al., 1987; Futuyma, 1998; Castro, 1999).

Tradicionalmente, Sistemática e Genética de Populações são domínios tratados de maneira independente pelos sistematistas e geneticistas, que empregam diferentes linguagens e diferentes conceitos a assuntos de importância comum. Porém, a introdução de dados de DNA mitocondrial em estudos de genética de populações, no final da década de 70, proporcionou um aumento de comunicação entre ambos (Avise et al., 1987), promovendo uma mudança de atitude em relação às perspectivas históricas e filogenéticas nos estudos de estrutura populacional intra-específica, e levou

ao desenvolvimento de um novo campo de investigação multidisciplinar chamado filogeografia (Avise, 1994).

A filogeografia é o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, inclusive no nível intra-específico (Avise et al., 1987), e gera informações importantes com relação aos processos evolutivos envolvidos na determinação dos padrões atuais de distribuição e diversificação entre populações e espécies, como por exemplo, a estrutura populacional intra-específica.

Uma espécie apresenta estrutura populacional quando consiste de várias populações entre as quais existe alguma restrição ao fluxo gênico, porém, a maioria das espécies não pode ser considerada como uma única unidade panmítica, pois é comum apresentarem algum grau de diferenciação genética entre suas populações (Slatkin, 1997). A distribuição espacial das variações intra-específicas dentro e entre populações (estrutura populacional) pode fornecer informações importantes sobre a história evolutiva das espécies, e a existência de barreiras ao fluxo gênico entre populações que acumularam diferenças genéticas a partir de um ancestral comum é uma das principais condições para a ocorrência do processo de especiação, a principal fonte geradora de biodiversidade. Estudos filogeográficos são capazes de detectar, não apenas a existência ou ausência de fluxo gênico entre populações, mas também os processos que levaram à distribuição espacial contemporânea dessas populações.

Para o entendimento da distribuição da variação genética dentro e entre populações, associada à sua distribuição geográfica, são necessários conhecimentos multidisciplinares, tais como genética molecular, genética de populações, demografia, etologia, cladística, paleontologia, geologia, e geografia. Isto porque, a quantidade e a distribuição da variação genética intra-específica é consequência não apenas de sua estrutura populacional atual, mas também de eventos históricos pelos quais a

população possa ter passado, tais como expansão de área de ocorrência, afunilamento populacional, eventos de fragmentação, isolamento, colonização e extinção, entre outros. As características biológicas dos organismos, tais como o modo de locomoção, o comportamento reprodutivo e o comportamento alimentar, também são fatores importantes que influenciam suas distribuições (Avice, 2000).

Em sua definição pura, a filogeografia lida com a distribuição espacial dos alelos dentro e entre populações, cujas relações filogenéticas são conhecidas ou podem ser estimadas. Assim, este campo de estudo está na junção crítica entre os estudos micro e macro-evolutivos, permitindo inferências sobre eventos históricos e processos populacionais atuais, contribuindo para as descrições das distribuições geográficas, das relações filogenéticas e distâncias genéticas entre as linhagens evolutivas dos organismos, proporcionando uma melhor compreensão da biogeografia regional e áreas de endemismos (Bermingham & Moritz, 1998).

A filogeografia procura interpretar a extensão e o modo pelo qual os processos históricos em populações podem ter deixado pistas da evolução na distribuição geográfica contemporânea das características genéticas dos organismos. Supondo, por exemplo, que duas populações foram separadas geograficamente por centenas de milhares de anos, uma análise filogeográfica apropriada deve indicar essa separação histórica, principalmente se a linhagem do gene analisada for neutra (Avice, 2000). Populações isoladas historicamente são as principais candidatas para apresentar diferenças nas adaptações genéticas, pois tiveram potencialmente longa exposição a pressões de seleção divergentes sem a influência homogeneizadora do fluxo gênico (Avice, 2000).

Estudos filogeográficos permitem a identificação de cenários históricos alternativos para os arranjos espaciais dos organismos e suas características. Por

exemplo, vicariância e dispersão são duas possibilidades consideradas para a origem de táxons separados espacialmente. Sob a interpretação vicariante, populações ou táxons relacionados foram separados quando a forma ancestral foi isolada por eventos ambientais (surgimento de uma montanha, mudança de um curso de um rio, etc.). Sob a interpretação da dispersão, determinado grupo taxonômico ocupa uma extensão de área devido à dispersão ativa ou passiva, a partir de um ou mais centros de origem (Templeton, 1998).

No final da década de 80 do século 20, Avise et al. (1987) afirmavam que os fatores biogeográficos históricos, assim como os fatores contemporâneos ecológicos e comportamentais, são importantes na modelagem da arquitetura genética das espécies viventes, levando a várias hipóteses filogeográficas intra-específicas, que mereceriam novas avaliações à medida que novas evidências moleculares se tornassem disponíveis. Mais de uma década depois, essas tendências filogeográficas puderam ser re-examinadas sob uma perspectiva genealógica, e assim foram definidas cinco categorias filogeográficas, tanto para árvores gênicas de DNA mitocondrial, quanto para outros marcadores (Avise, 2000). As cinco categorias propostas por Avise (2000) estão explicadas resumidamente abaixo:

Categoria I – Árvore gênica longa, principais linhagens alopátricas:

Esta categoria é caracterizada pela presença de haplogrupos limitados espacialmente e separados por distância mutacional relativamente alta. Pode haver também uma sub-estrutura espacial entre linhagens mais proximamente relacionadas dentro de certas regiões geográficas. Esses padrões aparecem comumente para DNA mitocondrial, e sugerem a presença, por muito tempo, de barreiras à troca gênica. Em espécies amplamente distribuídas, com pouca dispersão e alto fluxo gênico, a extinção de

haplótipos intermediários também pode contribuir para o surgimento de pronunciados “gaps” filogenéticos.

Idealmente, a confirmação dos processos históricos no nível populacional requer suporte concordante de múltiplos genes, ou com outras informações biogeográficas, tais como geologia ou sistemática.

Categoria II - Árvore gênica longa, principais linhagens amplamente simpátricas:

Este padrão é caracterizado por pronunciados “gaps” filogenéticos entre alguns ramos na árvore gênica, com as principais linhagens em simpatria por toda a área. Teoricamente, este padrão pode surgir em espécies com alto tamanho populacional efetivo e alto fluxo gênico. Assim, algumas linhagens antigamente separadas podem ter sido casualmente retidas, enquanto muitos genótipos intermediários foram perdidos através do tempo. A seleção balanceada pode facilitar este resultado favorecendo, em longo prazo, a sobrevivência evolutiva de algumas linhagens haplotípicas. Contudo, a maioria dos estudos com DNA mitocondrial que encontraram esse padrão como resultado, provavelmente envolve contato secundário entre populações ou espécies que evoluíram alopatriamente. Nestas situações, evidências independentes (geológicas, genéticas, ou morfológicas) geralmente sugerem que os distintos filogrupos de DNA mitocondrial divergiram em alopatria. Essas linhagens mitocondriais, assim como nucleares, atuam com marcadores genéticos distintos para investigações em populações onde possa ter ocorrido hibridização em zonas de contato.

Categoria III – Árvore gênica curta, linhagens alopátricas:

Nesta categoria, a maioria, ou a totalidade dos haplótipos são proximamente relacionados e localizados geograficamente. O fluxo gênico contemporâneo é baixo o bastante em relação ao tamanho populacional, permitindo a diversificação das linhagens entre populações, mesmo aquelas que estiveram em contato recentemente. A categoria III depende do nível do fluxo gênico histórico entre as populações que não estiveram separadas por barreiras biogeográficas.

Categoria IV - Árvore gênica curta, linhagens simpátricas:

Este padrão é esperado para espécies com alto fluxo-gênico e populações com tamanho efetivo pequeno, que não estiveram historicamente separadas por barreiras biogeográficas. Espécies em que o número de populações aumentou explosivamente e expandiram sua área de ocorrência recentemente, apresentam árvores genealógicas com ramos curtos, muitos dos quais amplamente dispersos pela área de ocorrência atual da espécie. Para espécies que se expandiram em tamanho recentemente, a partir de poucos fundadores, é esperado um padrão genealógico chamado de “filogenia estrela”, onde um haplótipo ancestral comum fica no centro da “estrela” e os haplótipos recentes derivados ficam a ele conectados independentemente por ramos curtos.

Categoria V – Árvore gênica curta, distribuição variada das linhagens:

Este é um padrão intermediário entre as categorias III e IV, que envolve as linhagens que são espalhadas geograficamente e também as linhagens proximamente relacionadas (cada uma confinada a uma ou poucas localidades próximas). Este padrão significa que está ocorrendo fluxo gênico fraco ou moderado entre as populações que são historicamente e fortemente conectadas. Haplótipos comuns (encontrados em muitos

indivíduos e/ou populações) geralmente são o estado ancestral (plesiomórfico), enquanto os haplótipos raros (encontrados em poucos indivíduos e/ou populações) são supostamente a condição derivada (apomórfica). Assim, haplótipos raros compartilhados por indivíduos ou populações são potencialmente marcadores cladísticos para clados recentes em uma árvore gênica.

Como citado anteriormente, o desenvolvimento da filogeografia foi impulsionado pela introdução de dados de DNA mitocondrial em estudos de genética de populações. O DNA mitocondrial tem sido fonte de dados para inferências genealógicas no nível intra-específico, pois oferece vantagens para análises filogenéticas no nível micro-evolutivo. As características do DNA mitocondrial têm, literalmente, forçado a adição de uma perspectiva filogenética nos estudos dos processos evolutivos intra-específicos e, como tal, tem servido de ponte entre disciplinas como sistemática e genética de populações (Avise et al., 1987).

Para se entender a importância do DNA mitocondrial em estudos filogeográficos, temos abaixo uma breve descrição da mitocôndria, seu genoma, e seu mecanismo de herança genética:

A mitocôndria é uma organela encontrada na maioria dos organismos eucariontes e sua função na célula envolve a degradação de açúcares e gorduras importantes na respiração celular. Esta organela possui uma molécula de DNA de fita dupla circular que codifica, aproximadamente, 5% da maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (Moritz et al., 1987). Além dos 37 genes mitocondriais descritos, dos quais 13 codificam RNAs mensageiros para proteínas envolvidas diretamente no processo do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, dois para subunidades ribossômicas e 22 para RNAs transportadores, existe também uma região

não codificadora conhecida como “rica em A+T” nos invertebrados e como “alça D” (*D-loop*) nos vertebrados, que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (Moritz et al., 1987). O mtDNA é considerado uma molécula econômica, pois praticamente toda a sua seqüência de nucleotídeos possui função codificadora; regiões espaçadoras, íntrons, pseudogenes, elementos transponíveis, e seqüências repetitivas são estruturas raras ou ausentes (Arias & Infante-Malachias, 2001). A figura 01 ilustra uma molécula de mtDNA de humanos que, devido ao seu caráter conservado, pode ser utilizada como modelo entre os vertebrados.

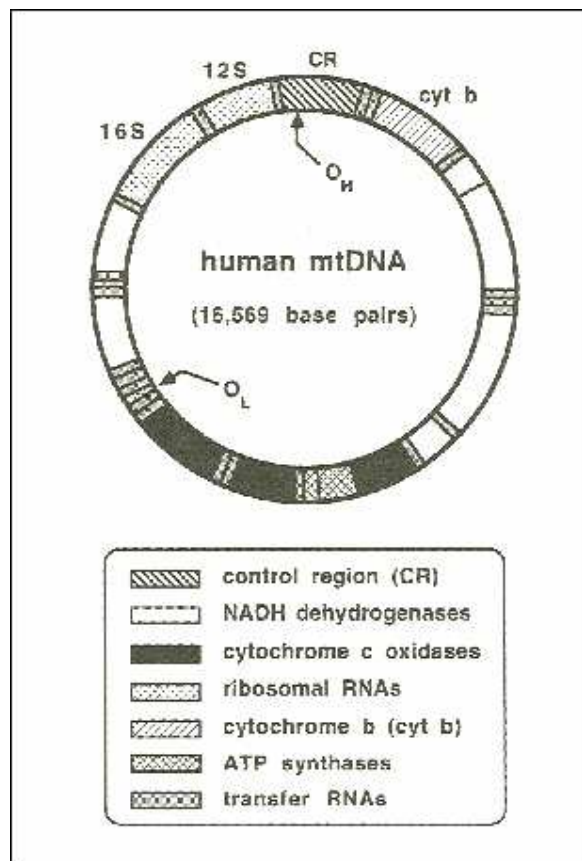


Figura 01. Estrutura e organização dos genes em uma molécula de DNA mitocondrial humano. O_H e O_L indicam a posição da origem da replicação das duas fitas da molécula (retirado de Avise, 2000).

Os ovócitos, células germinativas femininas, apresentam em seu citoplasma um grande número de mitocôndrias, sendo relatado para humanos algo em torno de cem mil mitocôndrias, enquanto nos espermatozóides o número não chega a cem, localizadas na região caudal (Scheffler, 1999, Eyre-Walker & Awadalla, 2001). Durante a fecundação, as mitocôndrias masculinas não chegam a penetrar no óvulo, e caso isso ocorra, existem mecanismos celulares que as destroem, impedindo assim que o DNA mitocondrial paterno seja transmitido aos descendentes (Eyre-Walker & Awadalla, 2001). Assim, o DNA mitocondrial é herdado pelos descendentes, machos e fêmeas, por uma via predominantemente materna, sem recombinação, caracterizando o padrão de herança matrilinear.

Durante a produção das células germinativas femininas, podem surgir uma ou mais mutações de ponto no DNA mitocondrial de uma dessas células. Ao se dividir, esta célula pode transmitir à célula filha a mutação recém-surgida, sendo esta então, herdada pelos novos indivíduos. Admitindo-se que não ocorre recombinação entre as moléculas de DNA mitocondrial, o número de diferenças entre as seqüências de dois indivíduos é proporcional ao tempo transcorrido desde o momento em que compartilharam seu último ancestral comum (Wallace, 1995). Assim, as características do DNA mitocondrial descritas acima, fazem com que essa molécula seja adequada para traçar uma genealogia materna.

Existe uma especial conexão entre filogenia matrilinear e demografia populacional (Avice, 2000). Para qualquer árvore gênica, a transmissão do DNA mitocondrial representa apenas uma minúscula fração da trajetória hereditária potencial numa genealogia populacional. Assim, é importante interpretar de forma crítica os resultados obtidos para o nível populacional a partir de poucos *loci* analisados. Por outro lado, genealogias traçadas a partir do DNA mitocondrial contêm informações

históricas, que vão além do que poderia ser restaurado a partir de frequências alélicas sozinhas (Avice, 2000). Além disso, dependendo do grupo taxonômico, quando há proximidade física das fêmeas com sua prole, a linhagem matrilinear, frequentemente, fornece conclusões relevantes sobre a demografia e estrutura populacional histórica, que em princípio, não são obtidas por nenhum gene nuclear (Avice, 2000).

Atualmente, genealogia de genes predominantemente mitocondriais são obtidas levando em consideração a Teoria da Coalescência. Segundo Avice (1998), “Teoria da Coalescência” é o termo atualmente aplicado às propriedades formais matemáticas e estatísticas das genealogias dos genes, sendo os resultados dessa disciplina altamente relevantes às interpretações filogeográficas moleculares.

Na primeira metade do século passado, Fisher (1930) e Wright (1931) estudaram os efeitos da probabilidade binomial relativamente à frequência alélica em populações pequenas depois de uma série de gerações. A distribuição das frequências gênicas em populações considerando apenas o efeito da deriva genética são as bases do modelo de Wright-Fisher (W-T). Este modelo leva em conta a probabilidade de uma população passar de um estado apresentando i cópias de um alelo para um estado apresentando j cópias desse mesmo alelo, e os procedimentos matemáticos são realizados utilizando-se da teoria da cadeia de Markov. A teoria da cadeia de Markov é um modelo matemático expresso em termos de estados descontínuos com probabilidades fixas de passagem de um estado a outro. Na cadeia de Markov, os estados descontínuos são dados por todas as possibilidades de estado (número de determinado alelo) de uma população num determinado momento do tempo. Uma importante contribuição dessa teoria é a possibilidade de se evidenciar a probabilidade de uma população se encontrar em determinado estado (i cópias de um alelo, ou j

cópias desse mesmo alelo) em algum momento particular de tempo (Fernandes-Matioli, 2001).

No entanto, o cálculo dessa probabilidade pela cadeia de Markov exige procedimentos matemáticos sofisticados. Assim, Ewens (1979) propôs uma nova maneira de se estudar os eventos evolutivos anteriormente baseados nos modelos de Wright-Fisher, porém sem a necessidade de procedimentos matemáticos profundos. Surgiram assim as bases do que é hoje conhecido como a teoria da coalescência, e os primeiros estudos de genealogia de genes baseados nessa teoria foram conduzidos por Kingman (1982), Hudson (1982), e Tajima (1983).

Uma amostra de genes de uma população representa mais do que uma contagem instantânea dos alelos na população. Cada gene amostrado possui uma história ancestral datada de milhares ou milhões de gerações atrás. É possível que um par de genes amostrado nos dias atuais tenha se originado de cópias idênticas de um mesmo alelo produzido por um mesmo indivíduo algumas gerações atrás. Ou então, os alelos podem ter tido um ancestral comum centenas de gerações atrás. O termo coalescência refere-se a este processo, “olhar para trás no tempo” e ver a história de dois genes a partir de um ancestral comum (Hartl e Clark, 1989). A figura 02 ilustra um esquema clássico da teoria da coalescência.

A teoria da coalescência considera a deriva genética como o processo evolutivo atuando na produção de uma geração para outra. Futuyma (1998) considera as seguintes premissas: 1) as frequências alélicas (ou haplotípicas) flutuam ao acaso, e eventualmente, um ou outro alelo são fixados; 2) assim, eventualmente, a população perde variação genética; 3) populações similares divergem na frequência alélica, e diferentes alelos podem ser fixados em cada uma; 4) a probabilidade, num tempo t , de

um alelo eventualmente ser fixado é igual a frequência desse alelo nesse tempo t ; 5) a taxa com que esses eventos ocorre, é maior quanto menor é o tamanho da população.

Ao se comparar seqüências homólogas de DNA, podem ser obtidas informações sobre a história evolutiva dessas seqüências, tais como aquelas que evidenciam quais as seqüências mais relacionadas entre si e aquelas que fornecem dados a respeito de que ponto no tempo as seqüências coalescem (Fernandes-Matioli, 2001). Desta maneira, a comparação entre seqüências amostradas a partir de indivíduos de populações de uma mesma espécie fornece informações genealógicas, permitindo a construção de árvores gênicas (Fernandes-Matioli, 2001) As árvores gênicas refletem o quanto duas seqüências estão próximas, e podem evidenciar o ponto no tempo em que se encontra a seqüência ancestral comum mais recente.

Considerando um cenário evolutivo ideal, tomamos a história recente de uma amostra de indivíduos haplóides, de uma determinada população, consistindo de t gerações e n linhagens. Na geração $t+1$ um único par de linhagens coalesce na seqüência ancestral comum mais recente de dois indivíduos amostrados. A cada geração precedente à primeira coalescência $n-1$, existirão ancestrais ou linhagens a seguir. Se uma dessas $(n-1)$ linhagens apresenta dois descendentes na amostra original, as outras linhagens apresentarão um só descendente. Chegará um momento no tempo em que todas as linhagens coalescerão em uma única, a qual representará o ancestral comum aos n indivíduos amostrados (Fernandes-Matioli, 2001).

Essas mesmas propriedades de genealogia envolvendo organismos haplóides podem ser aplicadas a genomas mitocondriais e, nesse caso, essas genealogias têm se mostrado importantes na formulação e também no teste de hipóteses envolvendo biogeografia histórica (Bermingham & Avise, 1986).

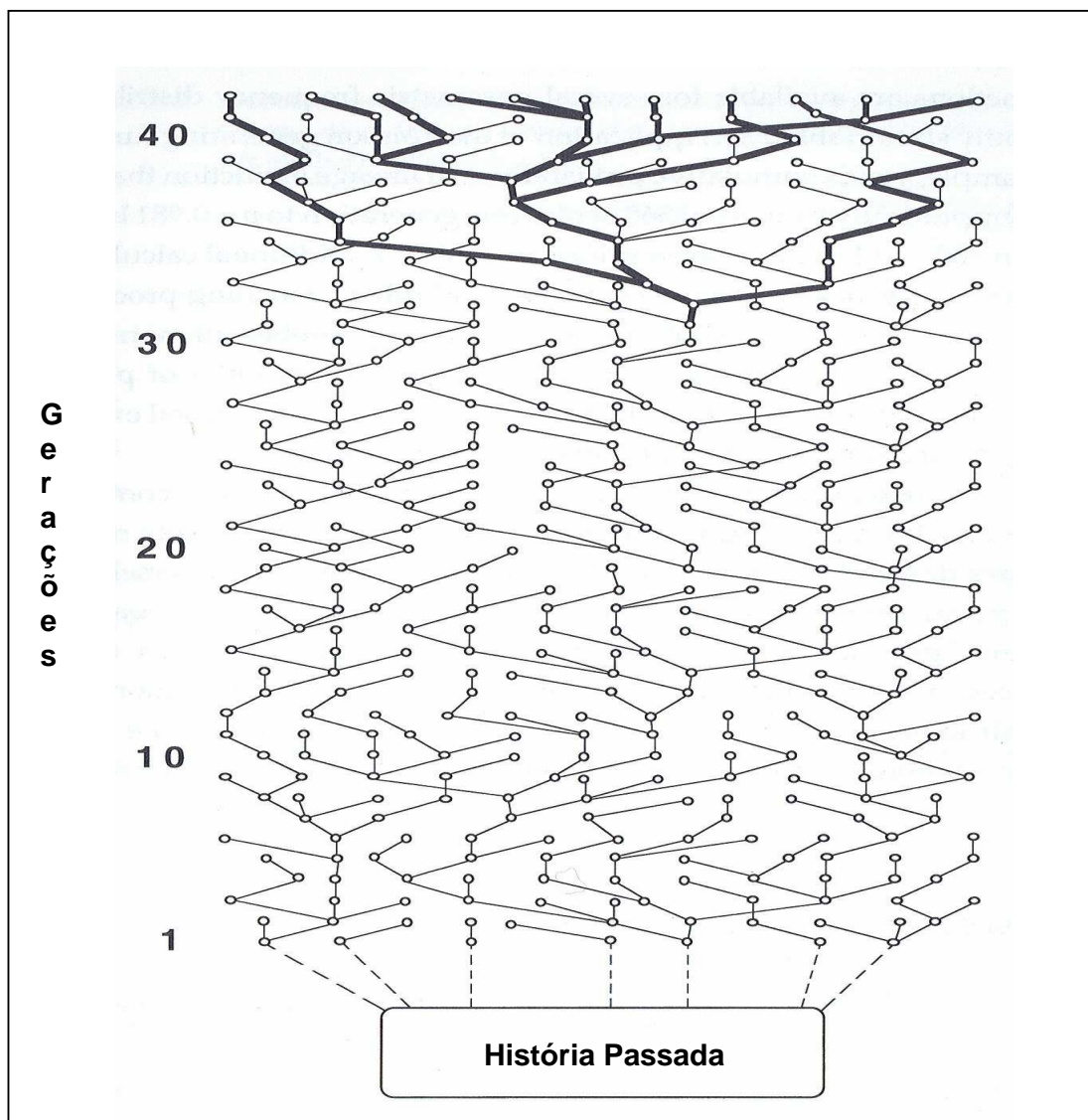


Figura 02. Representação esquemática do processo pelo qual uma linhagem pode passar dentro de uma população. É mostrada a trajetória matrilínea conectando mães e filhas através de mais de 40 gerações, sem a ocorrência de eventos genéticos como recombinação. Das sete linhagens representadas, apenas uma não se extinguiu durante esse intervalo de tempo. Todas as linhagens sobreviventes (topo) coalescem a uma mãe comum 10 gerações antes. Essa trajetória matrilínea coletiva descreve uma árvore gênica hierárquica e ramificada que reflete as rotas da hereditariedade transmitida através das moléculas de DNA mitocondrial (adaptada de Avise, 2000).

Estudos contextualizando temporal e espacialmente a diversidade genética populacional têm sido feitos utilizando diferentes marcadores moleculares, tanto do genoma nuclear (aloenzimas, RFLPs, RAPDs), quanto do genoma de organelas (mitocôndrias e cloroplastos). No entanto, devido às características do genoma mitocondrial citadas anteriormente, este se tornou o marcador que realmente

impulsionou o estudo da filogeografia, junto ao desenvolvimento matemático dos processos coalescentes (Avice, 1998).

Uma metodologia eficiente para estudos filogeográficos é a Análise de Agrupamento de Clados não Enraizados (Templeton, 1993, 1994, 1998; 2004; Crandall & Templeton, 1993). A Análise de Agrupamento de Clados não Enraizados é uma metodologia estatística que incorpora demografia e filogenia nas análises de variação espacial de linhagens intra-específicas. Esta análise detecta e testa os mecanismos evolutivos responsáveis pela distribuição espacial dos padrões genéticos observados, e também as possíveis deficiências relativas à amostra utilizada.

Esta análise inicia-se através da construção de um cladograma não enraizado a partir de uma árvore gênica de haplótipos mitocondriais, utilizando a parcimônia estatística (Templeton et al., 1987, 1992; 1995; Templeton & Sing, 1993; Crandall et al., 1994). O resultado inicial obtido é uma série de clados agrupados em uma árvore gênica hierárquica, em que cada nível é sucessivamente mais antigo do que qualquer clado contido dentro desse. A quantificação dos dados geográficos é feita através de duas distâncias estatísticas distintas (Templeton et al., 1995): 1)- a distância do clado (D_c), que mede a extensão geográfica da distribuição de um dado clado; e 2)- a distância do clado agrupado (D_n), que mede o quanto este clado é geograficamente distribuído em relação aos seus clados irmãos (clados posicionados um nível acima na rede de haplótipos). Contrastes entre clados dentro e entre diferentes níveis de agrupamento são usados para a discriminação entre as possíveis causas da estruturação geográfica da variação genética (Templeton et al., 1995; Templeton, 1998). Os níveis estatísticos significantes dessas medidas e os contrastes das distâncias são determinados por testes de permutação ao acaso.

A análise de agrupamento de clados não enraizado testa a hipótese nula da distribuição geográfica de todos os clados dentro de um clado agrupado ser ao acaso. A hipótese nula pode não ser rejeitada se: 1- a amostra for inadequada para detectar estruturação geográfica, e /ou 2- a população observada é panmítica na área amostrada. No segundo caso, o resultado pode ser tanto devido a amostragem, ou aos efeitos da deriva genética. Não é possível escolher entre essas duas alternativas, assim, a inferência genética está restrita aos casos em que a hipótese nula é rejeitada.

Quando a hipótese nula é rejeitada, Templeton et al. (1995) consideram três casos distintos que podem ser a causa da associação entre haplótipos e distribuição geográfica: 1- deriva genética restrita associada a fluxo gênico, especialmente fluxo gênico restrito por isolamento pela distância; 2- eventos históricos como fragmentação passada; 3- e eventos históricos como expansão da área de ocorrência. Os significados biológicos dessas possíveis causas estão explicados a seguir:

Fluxo gênico restrito por isolamento pela distância

Segundo Templeton (1998), fluxo gênico restrito implica em movimentação limitada de indivíduos durante uma geração, tempo insuficiente para um haplótipo recém surgido se espalhar geograficamente. Assim que uma mutação ocorre, o haplótipo resultante é encontrado apenas em sua área de origem. Com o passar das gerações, a linhagem haplotípica tem grandes chances de se espalhar por outras localidades através de fluxo gênico restrito. Dessa maneira, a distância do clado (D_c) deve aumentar com o passar do tempo sob o modelo do fluxo gênico restrito. É também esperado que esse aumento ocorra com o aumento dos níveis agrupados até que o nível agrupado mais alto seja alcançado, ou se o fluxo gênico for suficientemente alto, em relação ao tempo de coalescência da rede de haplótipos, o nível agrupado será

alcançado nos clados uniformemente distribuídos por toda área geográfica amostrada. Um outro aspecto do padrão esperado sob o modelo do fluxo gênico restrito, é que quando uma mutação ocorre e origina um novo haplótipo, este reside inicialmente dentro da área de seu haplótipo ancestral. Como o haplótipo ancestral é mais velho do que o novo haplótipo, este deve ter uma distribuição geográfica mais ampla. Então, quando o novo haplótipo começa a se espalhar através de fluxo gênico, ele freqüentemente permanece dentro da área geográfica de seu ancestral por muitas gerações, particularmente sob o modelo de isolamento por distância. Devida à forte tendência do haplótipo ancestral ser imediatamente interior ao haplótipo derivado na topologia da rede de haplótipos (Castelloe & Templeton, 1994), há também a tendência, sob fluxo gênico restrito, dos clados nas extremidades terem distribuição geográfica menor, e freqüentemente agrupados dentro da distribuição dos clados imediatamente interiores a eles. Além do mais, devido ao fato de ser esperado que o haplótipo ancestral ocorra com mais freqüência próximo à sua área geográfica de origem, a maioria das mutações do haplótipo ancestral também ocorrerá aí. Isso significa que os centros geográficos de todos os clados agrupados juntos devam estar perto, e conseqüentemente, a distância do clado (D_c) e a distância do clado agrupado (D_n) devem apresentar padrões similares sob fluxo gênico restrito (Templeton, 1998).

Fragmentação passada

Quando os níveis de agrupamento alcançam o período de tempo em que o evento de fragmentação ocorreu, a distância do clado (D_c) não ultrapassa a distribuição geográfica das sub-populações fragmentadas, porém a distância do clado agrupado (D_n) geralmente apresenta um acentuado aumento quando a fragmentação dos clados é causada por alopatria. Se o evento de fragmentação é tão antigo quanto a taxa de

mutações acumuladas, o ramo entre os clados apresentará grande distância de clado agrupado (D_n), e a distância do clado (D_c) tenderá a ser tão grande quanto a média dos comprimentos dos ramos na rede de haplótipos (devido ao acúmulo de mutações que diferenciou as sub-populações fragmentadas) (Templeton, 1998).

Expansão da área de ocorrência (incluindo colonização)

Quando ocorre expansão da área, os haplótipos encontrados na população ancestral que deu origem a expansão ficarão geograficamente espalhados (distância do clado– D_c - grande), e a distinção entre a distribuição geográfica relativa das extremidades contra os clados interiores, esperada sob o modelo do fluxo gênico restrito, pode ser quebrada. Além disso, alguns dos haplótipos encontrados nas populações expandidas podem ficar bastante distantes daqueles antigos, que ficaram confinados a área de pré-expansão (distância de clado agrupado– D_n -grande), particularmente quando colonização a longa distância está envolvida. Como as mutações começam a se acumular primeiro nas populações colonizadas, estas serão extremidades com distância do clado agrupado (D_n) grande, pois os haplótipos interiores que sofreram as mutações também existirão na área geográfica do ancestral (Templeton, 1998).

Para se minimizar possíveis erros nas inferências de eventos, esperados devido a limitações da análise de clados agrupados, foi proposto por Knowles & Maddison (2002) que se adicionasse a esta análise, uma metodologia estatística voltada a histórias filogeográficas mais complexas, permitindo assim a geração de modelos evolutivos envolvendo geografia e história, e fornecendo também as ferramentas para, sendo o caso, rejeitar tais hipóteses. Templeton (2004), propõe uma nova chave de

inferência para a Análise de Clados Filogeograficamente Agrupados, reduzindo assim a ocorrência de falsos positivos com desprezível perda de sua eficácia.

1.2 A filogeografia e a ictiologia neotropical de água doce

Vários trabalhos de filogeografia, utilizando como marcador molecular o DNA mitocondrial, têm sido feitos para peixes de água doce. No entanto, em comparação com os peixes neárticos e paleárticos, relativamente pouco se sabe, do ponto de vista genético, sobre as populações de peixes de água doce neotropicais (Bernartchez & Wilson, 1998). Avise (2000) lista cerca de 48 trabalhos publicados entre 1984 e 1987 e, dentre estes, nenhum é citado para a região neotropical. A partir de 1998 há um aumento considerável (aproximadamente 35%) do número de trabalhos publicados. Porém, apesar do uso de dados genéticos e biogeográficos combinados poderem fornecer uma luz nas origens e distribuições da notável diversidade da ictiofauna neotropical (Lovejoy & Araújo, 2000), ainda são poucos os trabalhos que tratam desse assunto. Entre estes, destacam-se os trabalhos de autores como Sivasundar et al. (2001), que utilizando seqüências de DNA mitocondrial, fizeram um estudo de estrutura de população e biogeografia dos prochilodontídeos das bacias dos Rios Paraná, Amazonas, Orinoco e Magdalena. Seus resultados mostraram que cada bacia contém uma linhagem monofilética de DNA mitocondrial, tendo a bacia do Rio Magdalena uma posição basal, com subseqüentes ramificações nas bacias do Orinoco, Amazonas, e Paraná. No entanto, não foi detectada estrutura filogenética associada à distribuição geográfica, e os resultados filogeográficos, incluindo a análise de agrupamento de clados não enraizado, sugerem alto fluxo gênico dentro das bacias. Turner et al. (2004), também investigaram a filogeografia e a variação genética em prochilodontídeos endêmicos das bacias dos rios

Orinoco, Essequibo, e Amazonas, utilizando seqüências de DNA mitocondrial. Seus resultados principais sugerem vicariância, demografia e seleção na modelagem da diversificação dos prochilodontídeos do norte da América do Sul. Lovejoy & Araújo (2000), realizaram uma análise filogenética de populações e espécies do gênero *Potamorhaphis* dos Rios Amazonas e Orinoco, utilizando seqüências do gene mitocondrial citocromo B. Os autores constataram uma forte estruturação populacional, não sendo encontrado haplótipos compartilhados entre as populações amostradas, indicando a presença de fluxo gênico restrito. As possíveis causas deste padrão podem ser a limitada dispersão, e barreiras geográficas atuais, ou passadas. Bermingham & Martin (1998) compararam seqüências de DNA mitocondrial de três gêneros de peixes primários amplamente distribuídos na baixa América Central e no noroeste da Colômbia (gêneros *Roeboides*, *Pimelodella*, e *Hypopomus*) e detectaram uma complexa história biogeográfica com ciclos de colonização, diversificação, e extinção de linhagens.

Apesar dos trabalhos citados acima apresentarem resultados variados, que podem estar relacionados com as diferenças entre os grupos estudados, como o tamanho, capacidade natatória, e tipo de ambiente que habitam, em geral, a maioria dos peixes de água doce apresenta estrutura filogeográfica pronunciadamente estruturada, com padrões freqüentemente relacionados a isolamentos históricos e bacias hidrográficas fundidas (Avice, 2000).

Os estudos de biogeografia histórica de peixes de água doce fornecem um elo natural entre a evolução biótica e geológica de uma área, devido ao fato da dispersão dos peixes dependerem diretamente das conexões entre bacias (Lundberg, 1993; Bermingham & Martin, 1998). Sob o ponto de vista zoogeográfico, os peixes mais importantes são os da divisão primária (Myers, 1938; Briggs, 1979), ou seja, aqueles que estiveram durante toda a sua história evolutiva confinados às águas doces. Tais peixes preservam antigos

padrões de distribuição geográfica, habitam determinadas bacias e dispersam-se de forma lenta e limitada (Myers, 1938; Darlington, 1957; Briggs, 1979; Lundberg, 1993).

As bacias de drenagem de água doce são, por definição, em algum ponto do tempo desconectadas, sendo assim esperado que as populações que habitam essas bacias sejam geneticamente estruturadas (Avice, 2000). No entanto, as paisagens e os cursos dos rios mudam através do tempo geológico, e as drenagens adjacentes podem ser conectadas repetidamente por capturas de cabeceiras ou fusão de desembocaduras, enquanto outras drenagens podem permanecer isoladas. Um efeito dessas conexões e dissociações através do tempo pode resultar em uma estrutura genealógica correspondente para as populações de peixes que habitam esses sistemas de água doce (Avice, 2000).

Com um número de espécies estimado em 8.000 (Vari & Malabarba, 1998), a fauna de peixes neotropicais de água doce é extremamente diversificada, especialmente na América do Sul. Devido principalmente a este fato, o conhecimento acerca das informações ecológicas, biológicas e sistemáticas desta fauna ainda é incompleto representando um sério inconveniente para a avaliação e compreensão dessa rica diversidade (Menezes, 1996). Com relação aos peixes de pequeno porte, essa situação é ainda mais grave (Castro, 1999), sendo o estudo da sua sistemática, evolução e biologia geral a grande fronteira e desafio da ictiologia sul-americana neste início de século (Castro & Menezes, 1998; Castro, 1999). De acordo com Castro (1999), a ictiofauna encontrada em riachos e cabeceiras tende a ser mais rica em número de espécies endêmicas do que aquela conhecida para os principais corpos d'água de uma bacia hidrográfica, e esta riqueza de espécies pode estar relacionada com a evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos.

O termo riacho, no contexto de Castro (1999), refere-se às partes de um sistema fluvial qualquer, geralmente de ordem (hierarquia fluvial) igual ou menor do que

quatro, apresentando dimensões físicas relativamente reduzidas, vegetação ripária densa, correnteza relativamente forte, fundo irregular formado predominantemente por areia grossa, cascalhos e rochas, água transparente e fria, alternância de poços e trechos de corredeira, e folhas em decomposição acumuladas no fundo dos poços e remansos. Devido à presença da vegetação ripária bloqueando total ou parcialmente a incidência de luz solar, a produção primária autotrófica local é baixa, sendo a comunidade lótica predominantemente heterotrófica, dependendo maciçamente da importação de material orgânico alóctone para subsistir (Vannote et al., 1980; Peres Neto et al., 1994).

Ao estudar comparativamente a composição e estrutura taxonômica da ictiofauna de quatro riachos brasileiros situados na região sudeste, Castro (1999) verificou que as linhagens filéticas das espécies dominantes (aproximadamente 60 a 85%) são das ordens Characiformes e Siluriformes, assim como na ictiofauna sul-americana em geral (aproximadamente 85% das espécies). Estes dados são comparáveis com os resultados encontrados por diversos autores para riachos não estuarinos da região neotropical (Lowe-McConnell, 1987, 1989), da Amazônia (Soares, 1979; Sabino & Zuanon, 1998), da Bacia do Rio São Francisco (Casatti & Castro, 1998), leste do Brasil (Costa, 1987; Peres Neto et al., 1994; Mazzoni & Lobón-Cervia, 2000), Mata Atlântica (Sabino & Castro, 1990; Aranha et al., 1998), Chaco Oriental da Argentina (Jacobo & Veron, 1995), Alto Rio Paraná (Uieda, 1984; Garutti, 1988; Penczak et al., 1994; Castro & Casatti, 1997; Pavanelli & Caramaschi, 1997; Castro et al., 2003, 2004, e 2005).

Castro (1999) observou ainda que a maioria absoluta das espécies de peixe dos quatro riachos é de pequeno porte, possuindo geralmente menos de 15 cm de comprimento padrão (de 80% a 100% das espécies), e que pelo menos 50% das espécies da ictiofauna continental sul-americana são de pequeno porte. Considerando estas informações, Castro (1999) sugere que a composição e a estrutura taxonômica da

ictiofauna dos riachos provavelmente reflitam, com pequenas modificações, a composição e estrutura taxonômica da ictiofauna dulcícola sul-americana (Castro et al. 2003, 2004, e 2005).

A predominância absoluta de espécies de pequeno porte na ictiofauna de riachos, ainda segundo Castro (1999), parece um padrão geral com real valor diagnóstico consistentemente detectável para riachos. A partir dessa conclusão, o autor identifica alguns padrões evolutivos provavelmente associados ao pequeno porte dos peixes em riachos:

1. A presença de um número elevado de caracteres morfológicos “reduativos”, aparentemente pedomórficos, ou seja, que representam a presença de caracteres primitivamente (no sentido evolutivo/filogenético) juvenis, larvais, ou embrionários em um adulto e provavelmente surgiram independentemente em várias linhagens evolutivas. Os caracteres “reduativos” observados em diferentes espécies foram o menor grau de desenvolvimento do sistema látero-sensorial cefálico e corporal, menor número de escamas corporais e raios das nadadeiras, menor grau de esculpuração superficial dos ossos cranianos e perda de ossos infra-orbitais, acompanhada muitas vezes pela presença de olhos relativamente grandes;
2. Elevado grau de endemismo, provavelmente associado a uma baixa capacidade de dispersão;
3. Ciclos de vida curtos e estratégias reprodutivas adequadas à rápida ocupação, ou re-ocupação, de ambientes ecologicamente instáveis como os riachos;
4. Utilização, permanente ou esporádica, de muitos micro-ambientes existentes nos riachos como abrigo contra predadores de porte maior;
5. Predominância de uma dieta baseada em insetos terrestres e aquáticos.

Os padrões evolutivos associados aos peixes de pequeno porte em riachos permitem supor que os ambientes de riacho exerceram pressões de seleção favorecendo fortemente o pequeno porte das espécies de suas ictiofaunas (Castro, 1999). As espécies de pequeno porte, em sua maioria, apresentam capacidade de deslocamento relativamente restrita, e como qualquer outra espécie de peixes, são limitadas pelas massas de terra dentro de grandes bacias hidrográficas (Castro, 1999). Southwood (1988), e Mann et al. (1990) sugerem que há uma forte relação entre as estratégias de sobrevivência das espécies com as características de seus habitats, ressaltando que existe um sistema de seleção natural destas estratégias.

De acordo com Castro (1999), ao longo de 65 milhões de anos da história evolutiva dos Otophysi, estes sofreram conseqüências das alterações geográficas e ecológicas que ocorreram nos corpos d'água sul-americanos e favoreceram o surgimento de numerosos eventos de vicariância que, associados à especiação alopátrica, possivelmente geraram a grande diversidade taxonômica da ictiofauna sul-americana representada pelos peixes de pequeno porte habitantes de riachos.

Assim, Castro (1999), propõe uma hipótese de que a capacidade de deslocamento relativamente baixa e limitada das espécies de pequeno porte, que restringe as suas distribuições geográficas, pode facilitar a separação geográfica de populações (vicariância), e desta forma favorecer o surgimento de novas espécies devido ao isolamento geográfico (alopatria).

1.3 A bacia do Alto Rio Paraná e *Astyanax altiparanae*

Dentre as grandes bacias hidrográficas da América do Sul, destaca-se a bacia do Alto Rio Paraná, que abrange, no Brasil, os territórios dos estados de Mato Grosso,

Paraná, São Paulo, e partes dos territórios dos estados de Minas Gerais e Goiás. Esta bacia é formada pelo Rio Paraná, que nasce da confluência dos Rios Grande e Rio Paranaíba, e diversos afluentes, e entre estes, estão grandes rios do estado de São Paulo, como os rios Tietê, Paranapanema, São José dos Dourados, Aguapeí, Rio do Peixe, Turvo e Pardo. A área desta bacia, no Brasil, limita-se geograficamente com as seguintes bacias hidrográficas brasileiras: bacia Amazônica, ao norte; bacia do Tocantins-Araguaia e bacia do Rio São Francisco, a noroeste; bacia do Atlântico Leste, a sudeste; e bacia do Uruguai, ao Sul. Além do território brasileiro, esta bacia estende-se pelo Uruguai, Paraguai e Argentina. O Rio Paraná, considerado em conjunto com o Rio Paranaíba, que é o seu prolongamento natural, tem uma extensão de quatro mil quilômetros. Partindo da confluência dos rios Grande e Paranaíba, o Rio Paraná corre em território brasileiro com orientação geral sudeste por cerca de 619 quilômetros até atingir os Saltos de Sete Quedas, atualmente submersos pelo reservatório de Itaipu, e deste ponto segue para sul passando a fazer fronteira entre Brasil e Paraguai numa extensão de 190 quilômetros até a foz do rio Iguazu, a partir de onde passa a ser limite entre a Argentina e o Paraguai (Ab' Saber, 1977).

O sistema do Alto Rio Paraná (Figura 03) pertence à região ictiofaunística do Paraná (Géry, 1969), que inclui os sistemas La Plata-Uruguai e Paraná-Paraguai, sendo o segundo maior sistema de drenagem na América do Sul, com 3,2 milhões de quilômetros quadrados (Lowe-McConnell, 1987), e inclui a drenagem da bacia do rio Paraná acima dos Saltos de Sete Quedas (atualmente inundados pelo Reservatório de Itaipu), abrigando grandes tributários como os rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema. Geograficamente, a drenagem do Alto Rio Paraná possui aproximadamente 900.000 quilômetros quadrados, incluindo o norte do estado do Paraná, o sul de Mato Grosso do Sul, a maioria do estado

de São Paulo (a oeste da Serra do Mar), o sul de Minas Gerais, o sul de Goiás e uma área pequena do Paraguai oriental adjacente ao Mato Grosso do Sul.

A área da bacia do Alto Paraná como um todo é uma bacia sedimentar que evoluiu sobre a Plataforma Sul-Americana, e sua formação teve início à cerca de 400 milhões de anos no Período Devoniano, terminando no Cretáceo, sendo hoje uma parte da face sul do Escudo Brasileiro. Inclui frações dos domínios morfoclimáticos de Mata Atlântica, Florestas de Araucárias e Cerrado, bem como as regiões de transição correspondentes entre eles (Ab' Saber, 1977).

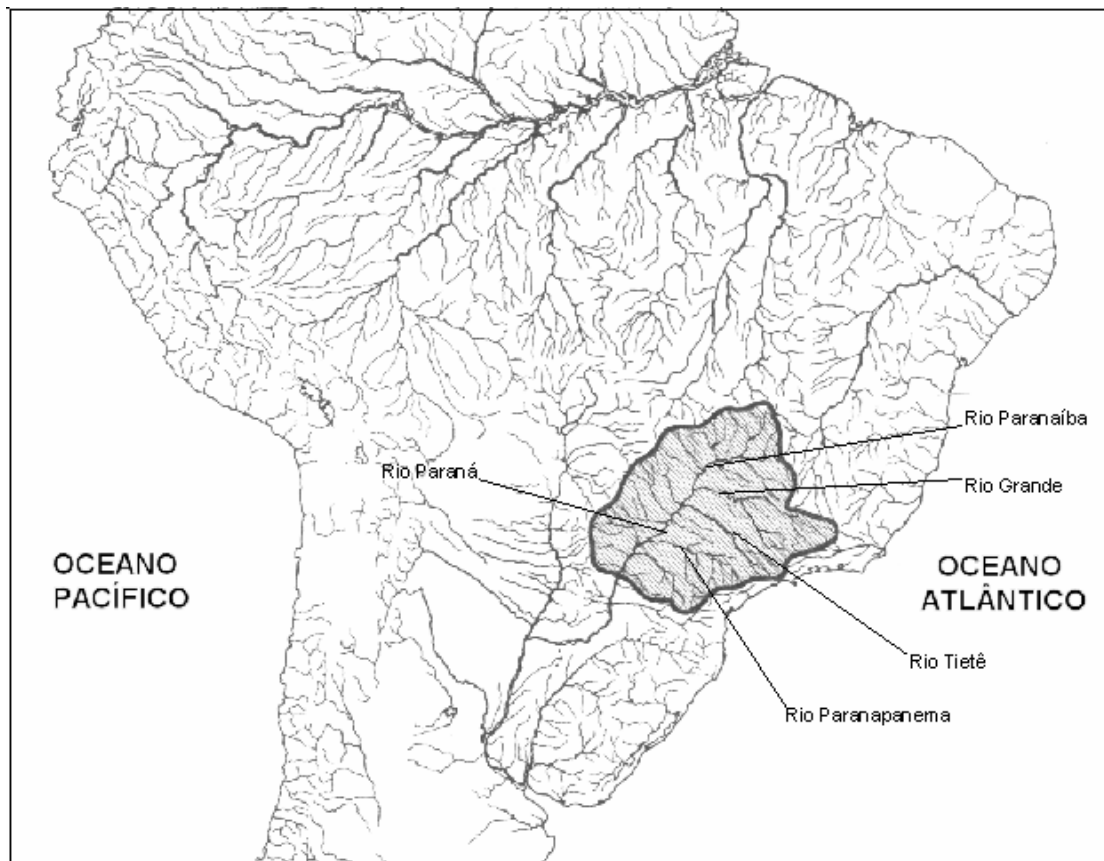


Figura 03. Mapa da América do Sul mostrando, em destaque, a localização da bacia do Alto Rio Paraná e alguns de seus principais rios (modificado de Castro et al., 2003 b).

Há evidências fortes de que, pelo menos para alguns grupos de peixes, o Alto Rio Paraná é uma área de endemismo, devido à presença dos Saltos de Sete Quedas, que isolaram por muito tempo a maioria da ictiofauna do Alto Rio Paraná da fauna remanescente dos sistemas dos rios La Plata e Uruguai-Paraná-Paraguai (Britski & Langeani, 1988; Menezes, 1988; Vari, 1988; Weitzman et al., 1988; Langeani, 1990; Menezes, 1996a, 1996b; Castro & Casatti, 1997).

No estado de São Paulo, o sistema do Alto Paraná contém 22 famílias e aproximadamente 170 espécies de peixes descritas, incluindo os maiores rios do estado (Rio Grande, Rio Tietê, Rio Paranapanema, Rio Aguapeí, Rio do Peixe, Rio Moji-Guaçu, Rio Sapucaí, Rio Pardo, Rio São José dos Dourados, Rio Piracicaba, entre outros) (Castro & Menezes, 1998). Estes grandes sistemas fluviais são habitados por espécies de médio a grande porte, como os curimatás (*Prochilodus* spp.), piaparas (*Leporinus* spp.), pintados (*Pseudoplatystoma* spp.), e jaús (*Paulicea luetkeni*), que normalmente apresentam distribuições geográficas extensas, e devido a sua importância comercial, são relativamente bem conhecidos sob os aspectos ecológico, biológico, e sistemático (Castro & Menezes, 1998).

Além dessas espécies de médio a grande porte, existem também as espécies de peixes de pequeno porte que habitam, principalmente, os riachos e cabeceiras associados aos grandes rios da bacia do Alto Rio Paraná (Castro & Menezes, 1998; Castro et al., 2003, 2004, e 2005).

Entre as espécies de peixes de pequeno porte encontradas na bacia do Alto Rio Paraná, encontram-se espécies do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854, popularmente conhecidos como lambaris, piabas, etc. O gênero *Astyanax* faz parte da superordem Ostariophysi, série Othophysii, ordem Characiformes, família Characidae, e até recentemente estava incluído na subfamília Tetragonopterinae (Eigenmann, 1917).

Porém, Reis (2003), restringiu a subfamília Tetragonopterinae a apenas um gênero, o gênero *Tetragonopterus*, e assim, o gênero *Astyanax* passou a ser considerado por Lima et al. (2003) como um dos muitos gêneros *incertae sedis* dentro de Characidae.

No gênero *Astyanax*, a espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 04) foi descrita por Garutti & Britski (2000), ao revisarem a espécie *A. bimaculatus* proveniente da bacia do Alto Rio Paraná, sendo considerada pelos autores em questão como endêmica desta bacia, onde possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a calha de grandes rios até as cabeceiras de riachos. É a única espécie do gênero na bacia a apresentar uma mancha negra horizontalmente ovalada, associada a duas barras verticais marrons situadas na região humeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos, que são os caracteres diagnósticos para o grupo *bimaculatus* (Garutti & Britski, 2000). A espécie *A. altiparanae* é conhecida popularmente por lambari-do-rabo-amarelo.



Figura 04. Exemplar de *Astyanax altiparanae*; LIRP 2911; 88,5 mm de comprimento padrão (foto Ricardo M.C. Castro).

É provável que, pelo fato de *A. altiparanae* ocorrer numa grande diversidade de micro-ambientes, as populações deste lambari não sejam homogêneas quanto à sua morfologia (Garutti, 1988a, 1993; Garutti & Figueiredo-Garutti, 1992). Existe uma plasticidade fenotípica que gera diferenças entre os indivíduos das populações de águas menos volumosas (como cabeceiras de riachos), e os indivíduos que habitam rios maiores. Os indivíduos de populações de riachos e cabeceiras apresentam tipicamente menor número de escamas na linha lateral, menor número de séries de escamas na linha transversal do corpo, e menor número de raios da nadadeira anal. Os indivíduos provenientes desses ambientes também apresentam o corpo mais baixo que os demais, havendo sobreposição de caracteres, em maior ou menor grau (Garutti, 1988b, 1993). Os indivíduos das populações de cabeceiras têm, ainda, um período reprodutivo mais longo,

com diversos picos de reprodução, enquanto os de populações dos rios tendem a ter um período reprodutivo relativamente curto (Garutti, 1989).

Astyanax altiparanae é uma espécie nectônica, nadadora rápida, pouco dependente de esconderijos nos micro-habitats bentônicos para evitar a predação (Casatti, 2002). Possui hábito alimentar onívoro, o que deve torná-la capaz de adaptar-se às ofertas alimentares diferenciais tanto do ponto de vista geográfico quanto sazonal (Castro et al., 2004), apresenta desovas parceladas durante todo o ano em pequenos corpos d'água como riachos, e desova total em grandes corpos d'água (Garutti, 1989), não apresenta cuidado parental (Agostinho & Júlio Jr., 1999), e os ovos são flutuantes (Godoy, 1975), fazendo com que a espécie seja, portanto, relativamente independente do substrato para reprodução. Esse conjunto de características pode estar relacionado com a ampla ocorrência desta espécie dentro da bacia (Castro et al., 2005). Diversos estudos relatam *A. altiparanae* como a espécie mais abundante tanto em número de indivíduos e biomassa, como também em relação à distribuição geográfica dentro da bacia do Alto Rio Paraná (Uieda, 1984; Garutti, 1988; Penczak et al., 1994; Castro e Casatti 1997; Pavanelli & Caramaschi, 1997; Castro et al., 2003, 2004, 2005).

Estudos populacionais com base genética têm sido realizados com esta espécie por diversos autores. Prioli et al. (2002) compararam duas populações de *A. altiparanae* com uma população de *A. bimaculatus* da bacia do Rio Iguaçu, utilizando como marcadores seqüências de DNA mitocondrial e RAPD. Os autores encontraram alta diversidade genética dentro de cada população, baixa distância genética sugerindo alto fluxo gênico, e alta similaridade do DNA mitocondrial entre as populações. Além disso, em conjunto com as similaridades morfológicas, os resultados demonstraram que a população de *A. bimaculatus* do Rio Iguaçu deveria ser considerada como *A. altiparanae*. Os autores sugerem ainda que a separação entre as populações da bacia do Rio Iguaçu da

bacia do Alto Rio Paraná é relativamente recente, e mantém a diversidade genética intrapopulacional representativa da população ancestral. Conseqüentemente, os autores propõem que a área de ocorrência de *A. altiparanae*, originalmente restrita a bacia do Alto Rio Paraná, deva ser ampliada. Matoso et al. (2004), analisaram a variação genética intra e interpopulacional de *Astyanax* sp. provenientes de populações de poços do parque estadual de Vila Velha -PR e do Rio Tibagi -PR (bacia do Alto Rio Paraná), utilizando como marcador RAPD. Os autores encontraram um alto polimorfismo de RAPD em uma das populações, o que sugere ou uma sobreposição de populações estruturadas, ou a presença de morfótipos coexistindo nesse local. Encontraram também uma proporção desigual de *loci* entre as populações, e consideraram importantes as diferenças encontradas entre as populações. No entanto, esses dados são pouco relevantes, já que os autores em questão não foram capazes de dizer com qual espécie, ou espécies, pertencentes ao gênero *Astyanax* trabalharam. Galindo et al. (2005), estudaram, utilizando como marcador RAPD, a estrutura genética de populações de *A. altiparanae* provenientes de dois ribeirões urbanos na cidade de Londrina (PR) e, através de cálculos de similaridade genética, os indivíduos analisados formaram dois grupos distintos, um com indivíduos coletados em um dos ribeirões, e outro com a maioria dos indivíduos coletados no outro ribeirão, o que parece refletir, segundo os autores, a expressiva variabilidade genética encontrada para esta espécie.

Os exemplos citados acima demonstram uma preocupação em se estudar a estrutura populacional de *A. altiparanae*, e de espécies do gênero *Astyanax* da bacia do Alto Rio Paraná, provavelmente devido a grande importância biológica destas espécies para esse ecossistema, e a grande capacidade de ajuste a condições ambientais diferenciadas.

No presente trabalho, a espécie *A. altiparanae* foi escolhida para, através de um estudo filogeográfico, verificar a possível existência de estrutura populacional nesta espécie, pois, as características biológicas anteriormente citadas, tais como uma capacidade natatória relativamente grande, hábito alimentar onívoro, biologia reprodutiva com desovas parceladas durante todo o ano em pequenos corpos d'água como riachos, e desova total em grandes corpos d'água, ovos flutuantes e ausência de cuidado parental, além da ampla ocorrência da espécie dentro da bacia do Alto Rio Paraná, indicam que a espécie *A. altiparanae* seja, dentre as espécies de peixes de pequeno porte habitantes de riachos e cabeceiras, a espécie com menos condições favoráveis a apresentar estrutura genética populacional. Ao se analisar a distribuição da variação genética dentro e entre populações, associadas à distribuição geográfica, são considerados os fatores históricos e/ou recorrentes que possam ter afetado essa distribuição.

Os resultados obtidos poderão permitir a comparação entre o padrão de estrutura populacional de uma espécie de peixe de pequeno porte que apresenta uma capacidade natatória relativamente alta, no caso, *A. altiparanae*, com o padrão de estrutura populacional de outras espécies de peixes de água doce de porte médio a grande, como por exemplo, os prochilodontídeos, que se encontram entre os melhores nadadores da ictiofauna neotropical (Castro & Vari, 2004).

1.4 Objetivos

Assim, este trabalho teve como principal objetivo verificar a possível existência de estrutura populacional na espécie *Astyanax altiparanae*. Para isso, populações provenientes da bacia do Alto Rio Paraná dentro do estado de São Paulo foram submetidas à uma Análise Filogeográfica, realizada utilizando como metodologia

principal a Análise de Agrupamento de Clados não Enraizado (Nested Clade Analysis) (Templeton, 1993, 1994, 1998; 2004; Crandall & Templeton, 1993), complementada pela análise da *Mismatch Distribution* (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Hapending, 1992) e pela Análise da Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier & Smouse, 1994), utilizando como marcador molecular, seqüências de parte do gene mitocondrial citocromo b, visando estabelecer não só os padrões filogenéticos atuais, mas também os processos evolutivos que os estabeleceram.

A partir dos resultados obtidos, foi discutida a validade da hipótese proposta por Castro (1999), que relaciona a capacidade de deslocamento relativamente baixa e limitada das espécies de pequeno porte com a separação geográfica de populações (vicariância), e prevê a estrutura de populações devido ao isolamento geográfico (alopatria), favorecendo assim o surgimento de novas espécies.

2 Material & Métodos

2.1 Indivíduos e populações amostradas

Para a realização desse estudo, foram analisados indivíduos de *Astyanax altiparanae* provenientes de 36 populações de riachos de onze sub-bacias da bacia do Alto Rio Paraná, localizadas no estado de São Paulo. Os indivíduos foram coletados durante as viagens de coleta realizadas no âmbito do projeto temático “Diversidade de Peixes de Riachos e Cabeceiras da bacia do Alto Paraná no estado de São Paulo”, entre os anos de 1999 e 2002, vinculado ao Programa BIOTA/FAPESP (processo FAPESP n.º 98/05072-8). Além dessas, com o objetivo de aumentar a amostra inicial, foram realizadas viagens de coleta às sub-bacias do Rio do Peixe e do Rio Sapucaí-Grande, durante o mês de julho de 2003. O número de indivíduos amostrados em cada população variou de 01 a 11, num total de 175 utilizados na realização desse trabalho. As sub-bacias coletadas, seus acrônimos e o número de cada população amostrada estão mostrados na Figura 05. OS números de indivíduos analisados provenientes de cada população amostrada estão listados na Tabela 01.

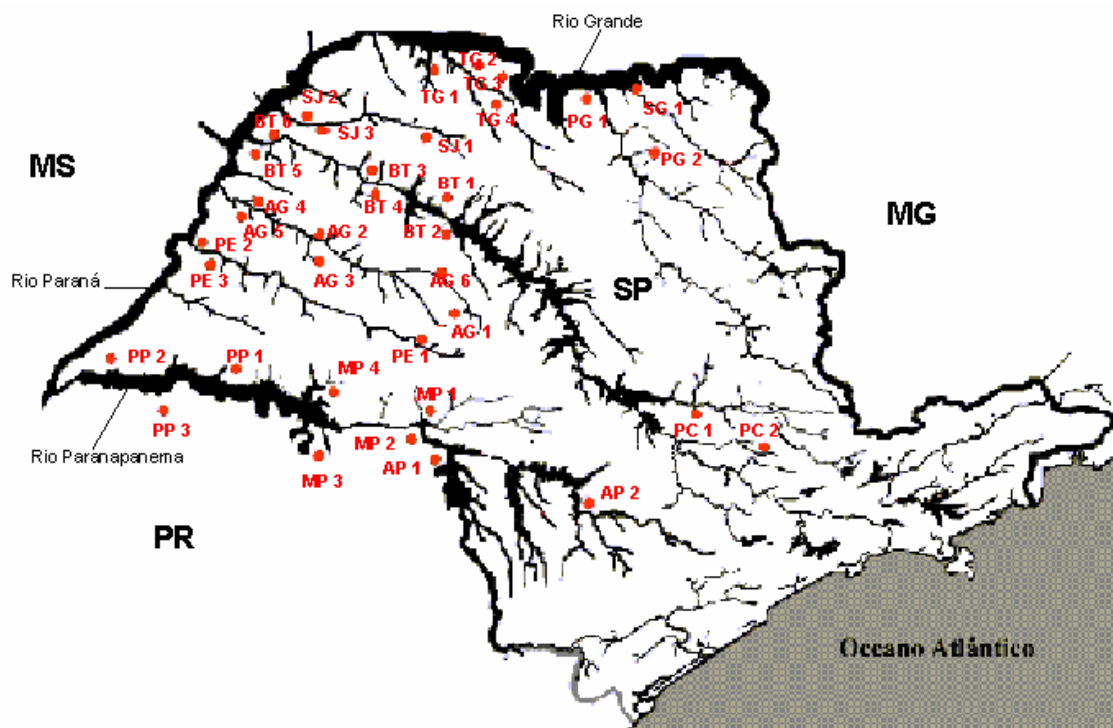


Figura 05. Mapa do estado de São Paulo mostrando as populações amostradas dentro de cada sub-bacia: SJ1, SJ2, SJ3- São José dos Dourados; BT1, BT2, BT3, BT4, BT5, BT6- Baixo Tietê; AG1, AG2, AG3, AG4, AG5, AG6- Aguapeí; PE1, PE2, PE3- Peixe; PP1, PP2, PP3- Pontal do Paranapanema; MP1, MP2, MP3, MP4- Médio Paranapanema; AP1, AP2- Alto Paranapanema; PC1, PC2- Piracicaba-Capivari-Jundiá; TG1, TG2, TG3, TG4 - Turvo-Grande; PG1, PG2- Baixo Pardo Grande; SG1- Sapucaí Grande:

Tabela 01. Número de indivíduos analisados em cada população amostrada.

População*	Número de indivíduos
SJ 1	6
SJ 2	10
SJ 3	10
BT 1	10
BT 2	2
BT 3	1
BT 4	10
BT 5	1
BT 6	9
AG 1	5
AG 6	1
AG 2	5
AG 3	1
AG 4	8

Tabela 01-continuação

AG 5	9
PE 1	11
PE 2	3
PE 3	1
PP 1	9
PP 2	1
PP 3	3
MP 1	1
MP 2	2
MP 3	8
MP 4	1
AP 1	2
AP 2	1
PC 1	4
PC 2	7
TG 1	7
TG 2	7
TG 3	4
TG 4	7
PG 1	6
PG 2	1
SG 1	1

*Ver Figura 05 para localização das populações amostradas.

2.2 Preparação e seqüenciamento do DNA

No campo, após a coleta e identificação dos indivíduos de *Astyanax altiparanae*, o procedimento para a obtenção de material para as análises moleculares consistiu em retirar fragmentos de tecido (muscular e/ou hepático) do organismo ainda vivo ou recém morto, utilizando pinça e bisturi que, após cada extração, eram limpos com álcool, as lâminas do bisturi trocadas, utilizando sempre lâminas novas em cada indivíduo. Os fragmentos foram individualmente acondicionados em tubos plásticos de 1,5 ml contendo etanol 96%, e posteriormente mantidos congelados a -20° C.

Extração do DNA

Para a extração do DNA dos fragmentos de tecidos preservados em etanol (múscular e/ou hepático), foram testados inicialmente três procedimentos, sendo dois utilizando conjuntos de reagentes industrializados - QIAmp Tissue Kit (QIAGEN) e Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), e o outro através da extração orgânica utilizando fenol e clorofórmio.

Os procedimentos que utilizam os conjuntos de reagentes QIAmp Tissue Kit (QIAGEN) e Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) proporcionam uma extração de DNA total rápida, eficiente e altamente pura, não sendo necessária extração orgânica ou precipitação do DNA com álcool.

Na extração utilizando o conjunto de reagentes QIAmp Tissue Kit (QIAGEN), o material (tecido hepático ou muscular) foi homogeneizado em 180 ul de tampão ATL (100 mM Tris base; 160 mM sacarose; 800 mM EDTA, pH 8,0) e 20 ul de Proteinase K (20 ug/ul), e em seguida, os tubos contendo esse homogeneizado foram incubados à 55°C por 01 hora. Após este período, foi adicionado mais tampão aos tubos, e estes foram incubados à 70°C, por 10 minutos. Para finalizar a extração, foi adicionado etanol (96-100%) aos tubos, que em seguida foram agitados no vórtex. O lisado foi então lavado em colunas. Com a utilização de tampões, ocorreu a adsorção seletiva de ácidos nucléicos a uma membrana a base de sílica gel, a qual permite a passagem livre de contaminantes. O DNA puro foi então eluído com água estéril, estando pronto para ser utilizado.

Na extração utilizando o conjunto de reagentes Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), o material (tecido hepático ou muscular) foi homogeneizado em 600 ul de uma solução de lise de núcleo e 18 ul de Proteinase K (17 mg/mL) e em seguida incubado a 65°C por duas horas. Aos tubos contendo o material

homogeneizado, foi adicionada uma solução de precipitação de proteínas e, após agitar no vórtex em alta velocidade por 20 segundos, estes foram transferidos para gelo por cinco minutos e em seguida centrifugados a 12000 rpm por quatro minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido, para outro tubo com isopropanol. Os tubos foram centrifugados novamente por um minuto e o sobrenadante foi removido. Aos tubos foi adicionado etanol 70%, e em seguida foram invertidos algumas vezes para lavar o DNA, e submetidos a uma nova centrifugação por mais um minuto. O etanol foi então retirado com o auxílio de uma micro-pipeta, e a re-suspensão do DNA foi feita em H₂O bi-destilada autoclavada.

O terceiro procedimento consiste na extração orgânica do DNA utilizando-se fenol e clorofórmio, e a precipitação com álcool, de acordo com o procedimento descrito por Shiozawa et al. (1992) *in* Almeida et al. (2001), com algumas modificações. Os principais passos estão descritos abaixo:

O material (tecido hepático ou fígado) foi primeiramente macerado e em seguida, a eles foi adicionado 1,0 ml de tampão TE 9 (Tris-HCl 500mM, EDTA 20mM, NaCl 10mM, SDS 1%, pH 8,0) e 5,0 ul de Pproteinase K (20 ug/ul). Este homogeneizado foi incubado a 60°C por três horas. Após este período, foram adicionados aos tubos 330 ul de uma solução 1:1 de fenol equilibrado e clorofórmio, que foram centrifugados por três minutos a 140000 rpm. Após a centrifugação, foram estabelecidas duas fases: a superior aquosa, contendo os ácidos nucleicos, e a inferior orgânica. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo e a ela foram adicionados 100 ul de uma solução 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. Fez-se uma nova centrifugação por três minutos a 140000 rpm. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo, e foram adicionados 33 ul de uma solução de NaCl 3M + 02 volumes de etanol absoluto. Esta mistura foi então armazenada a -20°C por 12 horas, em seguida foi submetida a uma

centrifugação por cinco minutos a 140000 rpm. Após a centrifugação, toda a solução foi retirada vertendo o tubo, mantendo o “pellet” (concentrado de ácidos nucléicos) no fundo. Ao “pellet”, foram adicionados 100 ul de etanol 70% e feita uma nova centrifugação por cinco minutos a 140000 rpm. Ao final, todo o álcool foi retirado do tubo, vertendo-o, e o mantendo-se o tubo aberto até o DNA ficar completamente seco (aproximadamente uma hora). A re-suspensão do DNA foi feita em H₂O bi-destilada autoclavada.

Apesar de terem sido testados esses três procedimentos para a extração do DNA, foi escolhida a utilização do conjunto de reagentes Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), por esta proporcionar uma extração eficiente, rápida e limpa, apresentando a melhor relação custo-benefício. Após a extração, as soluções contendo DNA foram corretamente identificadas e armazenadas a -20°C.

Isolamento do Gene Citocromo B mitocondrial

Como marcador molecular, foi utilizado o gene citocromo b mitocondrial. A escolha desse gene se deveu ao fato da existência nas suas seqüências de variação intraespecífica, descrita previamente para diferentes espécies animais (Apostolidis et al, 1997; Lydeard & Roe, 1997; Perdices et al., 2003).

A partir do DNA total extraído, o gene Citocromo B mitocondrial, foi amplificado e isolado *in vitro* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987). As reações de amplificações foram realizadas em volume final de 15 ul contendo 1,0 ul do DNA total, 1,5 ul de cada oligonucleotídeo (3,0 pmoles/ul), 1,5 ul de dNTP mix 200 uM, 1,5 ul de tampão 2,0 uM, 1,5 ul de taq DNA polimerase 1,0 U/ul, e 6,5 ul de H₂O destilada autoclavada. A reação foi realizada em um termociclador sendo iniciada com dois minutos a 96°C para a desnaturação, seguida de

25 ciclos com 96°C durante 20 segundos (desnaturação), 50°C por 10 segundos (ligação dos primers) e 60°C por quatro minutos (extensão). Eventualmente, para obter especificidade e rendimentos melhores, as condições da reação foram alteradas.

Escolha dos oligonucleotídeos

O principal requisito para se realizar uma reação de PCR é conhecer, previamente, a seqüência de bases nucleotídicas da região do gene que se deseja amplificar, para que possam ser escolhidos, e se necessário, desenhados os oligonucleotídeos. Para se obter os oligonucleotídeos, ou “primers”, utilizados nas reações de amplificação, foi procurada em um banco de dados (EMBL/GenBank - www.ncbi.nlm.nih.gov) a seqüência de bases nucleotídicas do gene citocromo B mitocondrial de espécies relacionadas a *Astyanax altiparanae*, tendo sido encontrada a de *A. mexicanus* (Números de acesso: AF045966- AF045997). A partir dessa seqüência, foram desenhados dois oligonucleotídeos, denominados P5MA (F) e P3MA (R). Os outros quatro oligonucleotídeos inicialmente testados, P5GLU (F), P5THR (R), P3GLU (F) e P3THR (R) foram obtidos a partir do trabalho de Zardoya & Doadrio (1998), também para *A. mexicanus*. Posteriormente, foram desenhados mais 3 oligonucleotídeos: P5REV (R), P5'B (F), e P3'B(R), utilizados tanto nas reações de amplificação, como nas reações de seqüenciamento. As seqüências de bases nucleotídicas desses oligonucleotídeos estão na Tabela 02, e um esquema da posição relativa desses oligonucleotídeos no gene citocromo B mitocondrial está mostrado na Figura 06.

Tabela 02. Oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação e seqüenciamento do gene Citocromo B mitocondrial

Oligonucleotídeo	Orientação*	Seqüência
P5MA ¹	F	5' CCT TCT TCT CCT ATG CCT AG 3'
P3MA ¹	R	5'CTG CAA CTA GGG CTC AGA ATA GG 3'
P5GLU ²	F	5'GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC A 3'
P5THR ²	R	5'ACC TCC RAT CTY CGG ATT ACA 3'
P3GLU ²	R	5'TCT TTA TAT GAG AAR TAN GGG TG 3'
P3THR ²	F	5'CAC GAR ACR GGR TCN AAY AA 3'
P5REV ³	R	5'GGA GAG GTA CAA GTA TG 3'
P5'B ³	F	5'CTG CAT TCG TTG GCT ATG 3'
P3'B ³	R	5'GAG AAT AGG AGT GCC AG 3'

¹ desenhados a partir de *Astyanax mexicanus*; ² obtidos em Zardoya & Doadrio (1998); ³ desenhados a partir de *Astyanax altiparanae*; * F -Forward; R:-Reverso.

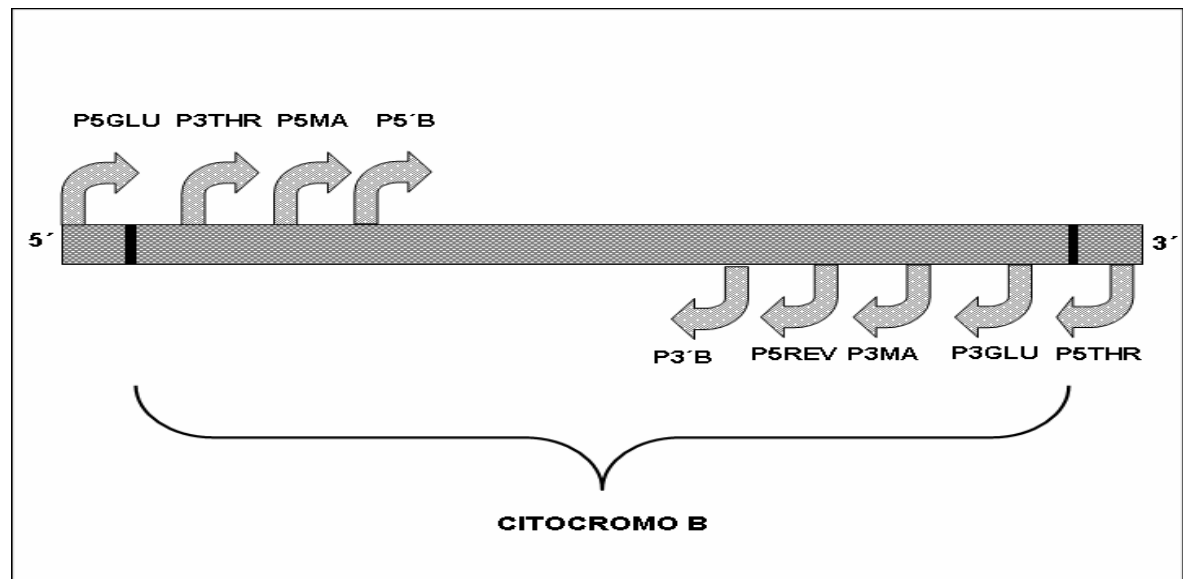


Figura 06. Posição relativa dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene citocromo B mitocondrial

Nas reações de amplificação, todas as combinações de oligonucleotídeos testadas amplificaram o gene citocromo B mitocondrial: P5GLU-P3GLU, P3THR-P5THR, P3MA-P5MA, P5GLU-P5THR, P3MA-P5GLU, P5MA-P5THR, assim, foi optado por se trabalhar principalmente com a combinação P5GLU-P5THR que, por ser composta por oligonucleotídeos localizados nas extremidades do gene, abrange sua maior parte.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram primeiramente analisados através de uma eletroforese em gel de agarose 1,0%. Nessa eletroforese foi aplicado, em cada poço do gel, 1,0 ul do DNA amplificado com 3,0 ul de corante Azul de Bromofenol. Em um poço foi aplicado 1,0 ul de um marcador de peso molecular onde cada banda corresponde a 100 pares de bases (100 Base-Pair Ladder, Amersham Pharmacia Biotech Inc.), com 2,0 ul de corante e 4,0 ul de H₂O destilada autoclavada. Em outro poço, foi colocado um “marcador branco” (todos os reagentes, exceto o material genético), que possibilita detectar se houve contaminação.

Após uma hora sob corrente constante de 80V, o gel foi corado com Brometo de Etídio, e o DNA foi visualizado por fluorescência através de um transiluminador equipado com luz ultravioleta. Dessa forma, foi possível checar se o fragmento foi isolado e amplificado, se houve contaminação do material e também calcular, aproximadamente, o número de bases nucleotídicas do fragmento de DNA.

Purificação do DNA

Ao término da reação de amplificação, resíduos de reagentes (dNTPs, oligonucleotídeos, etc.) junto ao produto resultante interferem no resultado da reação de seqüenciamento. Assim, o DNA extraído e amplificado foi purificado através de dois procedimentos distintos.

Um deles consistiu na utilização de um produto industrializado pronto, o ExoSAP-IT (USB Corporation). O ExoSAP-IT utiliza duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I e a Shrimp Alkaline Phosphatase para remover os resíduos de dNTPs e oligonucleotídeos. A Exonuclease I degrada resíduos de oligonucleotídeos de fita simples e qualquer DNA de fita simples resultante da PCR. A Shrimp Alkaline Phosphatase hidrolisa restos de dNTPs que podem interferir na reação de seqüenciamento. A reação de purificação, seguindo as instruções do fabricante, utiliza 5,0 ul do produto amplificado e 2,0 ul ExoSAP. Em um termociclador, essa solução foi incubada a 37°C por 15 minutos, e em seguida a 80°C por 15 minutos. Apesar desse procedimento ser rápido e eficiente, apresentando ótimos resultados, seu custo financeiro é elevado.

Também foi utilizado um outro procedimento, a Reação de Purificação utilizando PEG. A reação de Purificação com o PEG (abreviação para Polietilenoglicol) consistiu na seguinte seqüência de etapas: Em tubos de microcentrífuga (0,5 ml) foram colocados 7,5 ul da PCR e 11 ul de PEG; em seguida, os tubos foram encubados a 37°C por 15 minutos e posteriormente foram centrifugados a 15000 g (14000 rpm) por 15 minutos (T° ambiente); o sobrenadante foi então descartado (aspirado com micropipeta), e foram adicionados 30 ul de EtOH 80% gelado. Os tubos foram novamente submetidos a uma centrifugação por 1 minuto, sendo em seguida descartado o sobrenadante. Este último passo foi então repetido mais uma vez, e os tubos colocados

para secar a 37°C por 1 hora, ou temperatura ambiente durante a noite. O DNA purificado foi então dissolvido em 10 µl de TLE (pipetar várias vezes).

Reação de Seqüenciamento do DNA

As amostras de DNA amplificadas após serem purificadas foram submetidas a reação de seqüenciamento pelo método “Sanger Dideoxy Sequencing” (Sanger et al., 1977 in Hillis et al, 1990) ou interrupção controlada da replicação enzimática do DNA, utilizando dideoxynucleotídeos para produzir discretos fragmentos de DNA. Em um termociclador a fita dupla de DNA é primeiramente desnaturada e separada em duas fitas simples. Em seguida, o oligonucleotídeo escolhido junta-se à fita simples. Esta fita é então dividida em quatro partes, chamadas de sub-amostras, e em cada uma é ligado um dos quatro deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, marcados fluorescentemente) e a enzima DNA polimerase. Um dos quatro dideoxynucleotídeos (ddNTP) é adicionado a cada uma das sub-amostras (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP). A seqüência de DNA é estendida pela enzima DNA polimerase. Para a realização dessa reação foi utilizado o conjunto de *reagente BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems Inc.)*, o qual contém os nucleotídeos e enzimas necessários à reação. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento foram o P5GLU, P5THR, P5REV, P5´B, P3´B.

Para cada amostra a ser seqüenciada em microplaca de 96 poços, foram usados aproximadamente 500ng de DNA (1 a 2 µl), 2 µl de “primer”, 2 µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxynucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase.), 2 µl de tampão de diluição do “Big Dye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10 µl. A microplaca foi então selada, e levada ao vortex por 1 minuto, em seguida, foi centrifugada

rapidamente a 1.000 rpm. O programa de PCR utilizado foi: desnaturação - 96°C por 2 minutos (passo inicial); desnaturação - 96°C por 50 segundos; pareamento - 50°C por 5 segundos; extensão - 60°C por 4 minutos. Número total de ciclos: 25. Manutenção: 4°C por tempo indeterminado.

Purificação e precipitação da reação de seqüenciamento:

O produto das reações de PCR foi precipitado com 80 µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vórtex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 45 minutos, a 4.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, o precipitado foi secado a temperatura ambiente. Este precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% e a seguir, centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O etanol foi removido completamente por centrifugação, com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora.

Após a precipitação das reações de PCR, cada amostra foi ressuspensa em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), a placa foi levada ao vortex por 1 minuto, centrifugada e colocada a 95°C por 5 minutos, para desnaturação das amostras. As placas foram colocadas no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), que contém 16 capilares preenchidos por poliacrilamida. A leitura das bases nucleotídicas foi analisada pelo programa de computador, o ABI 3100 Data Collection. O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (Prof. Maria Helena de Souza Goldman - FFCLRP-USP), e também no Laboratório de Genética Molecular e Bio-Informática (Prof. Wilson da Silva Junior - Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto).

2.3 Análises

Leitura e alinhamento das seqüências

O Alinhamento de múltiplas seqüências é o processo de alinhar três ou mais seqüências de maneira a obter o máximo de seqüências de caracteres (nucleotídeos ou aminoácidos) similares possíveis. Os alinhamentos resultantes podem servir a dois propósitos principais: 1) achar regiões de seqüência similares em todas as seqüências que definem um padrão conservado de caracteres; 2) se o alinhamento é particularmente coerente, usar as posições alinhadas para derivar uma possível relação evolutiva entre as seqüências. As seqüências de DNA obtidas foram primeiramente visualizadas na forma de cromatogramas através do programa computacional *Chromas* versões 1.55, 2.3 (Technelysium, 1998, 2004). Esse programa permite também a inversão das seqüências quando o seqüenciamento é feito utilizando o oligonucleotídeo reverso. Em seguida foram alinhadas com o auxílio do programa computacional BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0 (Hall, 1999).

Estatística descritiva

Para quantificar a variação presente nas seqüências de DNA, foram realizadas análises estatísticas descritivas com o auxílio do programa computacional DnaSP v. 4.10 (Rozas et al., 2005). Foram estimados os seguintes parâmetros: quantidade de *sítios polimórficos ou segregantes* (S) – número de sítios que mostram variação entre as seqüências amostradas; *sítios monomórficos*; *diversidade haplotípica* (Pi) – número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas seqüências; *número médio de diferenças nucleotídicas* (k) – média das diferenças nucleotídicas entre pares de seqüências tomadas ao acaso na população amostrada; *número total de*

mutações (h) e a *diversidade haplotípica* – medida de variação genética considerando o número real de mudanças de bases nucleotídicas entre as seqüências.

Testes de neutralidade

Foram realizados o teste D de Tajima (Tajima, 1989; Tajima, 1996), e o teste de neutralidade de Fu (Fu, 1997), que se baseiam no modelo de sítios-infinitos sem recombinação, apropriado para seqüências curtas de DNA e haplótipos de RFLP, ou seja, a taxa de mutação não é homogênea, o que pode causar rejeição da neutralidade quando outras forças evolutivas estão envolvidas (Tajima, 1996).

O teste D de Tajima compara dois estimadores de parâmetros populacionais θ , em que θ pode ser estimado utilizando o número de sítios segregantes (S), ou o número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre as seqüências amostradas. Considerando a evolução como sendo neutra, as estimativas baseadas em S ou k dariam o mesmo valor para θ , já a diferença (D) entre as estimativas de θ dadas por S e k serviria como um teste de neutralidade das mutações ($D = 0$ – neutralidade). Um valor significativo de D pode também ser devido a outros fatores que não só ação de seleção, tais como expansão ou afunilamento populacional, ou heterogeneidade das taxas de mutação (Tajima, 1996). O teste de Fu (Fu, 1997) estima a probabilidade de encontrar ao acaso uma amostra neutra com um número de alelos similar ou menor do que os valores encontrados, dado o número de diferenças nucleotídicas encontradas, tomado como um estimador de θ . Fu (Fu, 1997) chama esta probabilidade de S' e define F_s estatístico como um log de S' . O F_s estatístico é um parâmetro muito sensível à expansão demográfica populacional, a qual conduz a um grande valor negativo de F_s . Tanto a significância do D estatístico como a do F_s estatístico são testadas gerando amostras ao acaso sob a hipótese de seletividade neutra e equilíbrio populacional

usando um algoritmo de simulação coalescente adaptado de Hudson (1990). Os testes de neutralidade de Tajima e Fu foram realizados através do programa computacional Arlequin v. 2000 (Schneider et al., 2000).

Análise filogeográfica

A comparação entre seqüências homólogas amostradas de populações de uma mesma espécie fornece informações genealógicas, permitindo a construção de árvores gênicas, ou no caso do DNA mitocondrial, rede de haplótipos. (“network”), que contém a relação temporal dos haplótipos a um ancestral comum. Essa rede é multifurcada, já que haplótipos descendentes podem coexistir com seus ancestrais (Posada & Crandall, 2001). A associação entre haplótipos e distribuição geográfica pode existir devido ao fluxo gênico restrito, eventos históricos (fragmentação, expansão, colonização), ou a uma combinação desses fatores. A análise de agrupamento de clados não enraizado (“Nested Clade Analysis”, Templeton et al., 1995) é precedida pela construção da rede de haplótipos, e permite a identificação dos eventos, recorrentes ou históricos, responsáveis pelo padrão de distribuição de um táxon.

Para se estimar a rede de haplótipos, foi utilizada a parcimônia estatística (Templeton et al., 1998). O algoritmo da parcimônia estatística começa estimando o número máximo de diferenças entre os haplótipos, tais como simples substituições (aquelas que não são o resultado de múltiplas substituições em um único sítio), com uma confiança estatística de 95%. Este número é chamado de limite da parcimônia. Em seguida, haplótipos diferindo por uma mudança são conectados aqueles diferindo por duas, por três e assim por diante, até que todos os haplótipos sejam incluídos em uma simples "network" ou até que o limite da parcimônia seja atingido. Este método enfatiza o que é compartilhado entre os haplótipos que difere minimamente em lugar das

diferenças entre os haplótipos e fornece uma avaliação empírica do desvio da parcimônia. Este método permite a identificação de supostos recombinantes olhando na distribuição espacial na sequência de homoplasias definidas pela "network" (Posada & Crandall, 2001). A rede de haplótipos obtida a partir das sequências utilizadas foi gerada pelo programa TCS: Estimating Gene Genealogies, versão 1.13 (Clement et al., 2000).

A partir da obtenção da rede de haplótipos, foi realizada a análise de agrupamento de clados não enraizado ("Nested Clade Analysis"), proposta por Templeton et al. (1995), (Templeton, 1997, 1998). O primeiro passo na análise é converter a rede de haplótipos em uma série de ramos agrupados utilizando as seguintes regras de agrupamento: Partindo de um haplótipo individual localizado na extremidade da "network", vai-se em direção ao interior contando um passo mutacional e forma-se a união de todos os haplótipos conectados a esse ramo comum. Essa união de haplótipos é denominada clado de 1 passo. Esse processo é repetido até que todos os haplótipos localizados nas extremidades sejam colocados em um clado de 1 passo. Em seguida, os clados de um passo passam a ser tratados como unidades taxonômicas operacionais, e o algoritmo de agrupamento é repetido, formando os clados de 2 passos, e assim sucessivamente até que sejam alcançados todos os níveis de agrupamento possíveis, englobando toda a rede de haplótipos.

O segundo passo da análise é a quantificação dos dados geográficos através de duas distâncias estatísticas distintas (Templeton et al., 1995): 1)- a distância do clado (D_c), que mede a extensão geográfica de um dado clado; e 2)- a distância do clado agrupado (D_n), que mede o quanto este clado é geograficamente distribuído em relação aos seus clados-irmãos (clados posicionados um nível acima na rede de haplótipos). Contrastes entre clados dentro e entre diferentes níveis de agrupamento são usados para

a discriminação entre as possíveis causas da estruturação geográfica da variação genética (Templeton et al., 1995, Templeton, 1998). Os níveis estatísticos significantes dessas medidas e os contrastes das distâncias são determinados por testes de permutação ao acaso.

O terceiro passo da análise é diagnosticar a polaridade da rede de haplótipos. O enraizamento da rede de haplótipos é extremamente difícil através de metodologia tradicional (utilização de grupo externo), e normalmente não funciona (Maddison et al., 1992; Templeton, 1992). No entanto, a teoria da coalescência indica que há informação considerável sobre polaridade temporal na própria rede de haplótipos não-enraizada e nas frequências haplotípicas (Castelloe & Templeton, 1994). Castelloe e Templeton (1994) distinguem topologicamente duas classes de clados, a dos clados localizados nas extremidades e que são conectados ao resto do cladograma através de apenas um passo mutacional; e clados localizados interiormente, que são conectados ao resto do cladograma por dois ou mais passos mutacionais, e representam os nodos interiores. Os clados localizados nas extremidades são considerados mais jovens do que os clados interiores aos quais eles estão conectados. Uma limitação do uso da teoria da coalescência na determinação das idades relativas dos clados é que, segundo Castelloe & Templeton (1994), embora o contraste extremidade/interior seja muito forte, é muito difícil a discriminação das idades relativas das extremidades como um grupo e dos interiores como um grupo. Na análise de agrupamento de clados não enraizado, todas as distâncias e cálculos estatísticos são realizados dentro do clado que agrupa os clados evolutivamente relacionados, ou seja, extremidades são contrastadas com clados especificamente interiores a elas, e não contrastadas com outras extremidades. Conseqüentemente, o contraste de clados interiores com de extremidades dentro de um clado agrupado de um dado nível, tende fortemente a ser o contraste entre o clado mais

antigo com o clado mais jovem. Assim, dentro de cada categoria de agrupamento e para ambas as distâncias (Dc e Dn), é também calculada a significância estatística da média das distâncias dos cladões interiores menos a média da distância dos cladões das extremidades, contanto que não exista ambigüidade na variabilidade da extremidade/interior entre os cladões do clado agrupado (Templeton, 1995). Os cálculos de Dc e Dn, e suas significâncias foram realizados através de análise de permutação ao acaso, baseada em 1000 re-amostragens, utilizando o programa Geodis 2.4 (Posada & Templeton, 1999).

A análise de agrupamento de cladões não enraizado testa a hipótese nula de a distribuição geográfica de todos os cladões dentro de um clado agrupado ser ao acaso. A hipótese nula pode não ser rejeitada, se: 1- a amostra for inadequada para detectar estruturação geográfica, e /ou 2- a população observada é panmítica na área amostrada. No segundo caso, o resultado pode ser tanto devido a amostragem, ou aos efeitos da deriva genética. Não é possível escolher entre essas duas alternativas, assim, a inferência genética está restrita aos casos em que a hipótese nula é rejeitada. Quando a hipótese nula é rejeitada, Templeton et al. (1995) consideram três casos distintos que podem ser a causa da associação entre haplótipos e distribuição geográfica: 1- deriva genética restrita associada a fluxo gênico, especialmente fluxo gênico restrito por isolamento por distância; 2- eventos históricos como fragmentação passada; e 3- eventos históricos como expansão da área de ocorrência.

Análise da variância molecular (AMOVA)

Aliada ao estudo filogeográfico, que qualifica os processos evolutivos que podem estar envolvidos em determinado padrão encontrado, a análise de variância molecular contribui para quantificar o grau da variabilidade genética encontrada.

A variabilidade genética pode estar organizada de três maneiras diferentes: 1- variabilidade genética não estruturada entre populações (uma só população); 2 – mesmo nível de variabilidade genética, mas organizada entre populações; 3 – mesma magnitude de variabilidade genética, mas organizada dentro e entre as populações. Os fatores que levam a estruturação genética em populações são: deriva, mutação, seleção e fluxo gênico. Entre estes, deriva, mutação e seleção são responsáveis pelo aumento da estruturação genética, enquanto o fluxo gênico diminui a estruturação da variação genética.

A análise da variância molecular – **AMOVA**- (Excoffier & Smouse, 1992) é uma abordagem para a análise de estruturação de populações onde a variância das frequências gênicas é subdividida em vários componentes hierarquicamente inclusivos, como a variância entre regiões geográficas, a variância entre sub-populações (Φ_{st}), ou a variância residual entre os indivíduos. A interpretação dos valores de Φ_{st} é semelhante a dos valores das estatísticas F_{st} (Wright, 1978) e G_{st} (Nei, 1973). Valores não significativos nos dizem que a hipótese nula da panmixia não pode ser rejeitada e indicam a necessidade de outros estudos para a verificação da homogeneidade. Para estimativas de F_{st} , G_{st} ou Φ_{st} significativamente diferentes de zero, valores superiores a 0,05 são indicadores de alta estruturação populacional, enquanto valores abaixo de 0,05 indicam baixa estruturação (Wright, 1978)

É necessário estabelecer uma estrutura a ser testada, e isso é conseguido alocando as diferentes populações em grupos de acordo com critérios pré-definidos. A análise hierárquica de variância leva a partição da variância total em componentes de covariância devido a diferenças de indivíduos dentro de populações (Φ_{st}), entre populações de um mesmo grupo (Φ_{sc}) e entre grupos (Φ_{ct}). O Φ_{st} é a correlação entre haplótipos aleatórios dentro de populações, em relação a correlação entre pares de

haplótipos aleatoriamente amostrados na amostra total. O Φ_{ct} corresponde a correlação entre haplótipos aleatórios dentro de um grupo de populações em relação a correlação entre pares de haplótipos aleatoriamente amostrados na amostra total. Por fim, o Φ_{sc} equivale a correlação entre haplótipos aleatórios dentro de populações em relação a correlação entre pares de haplótipos aleatoriamente amostrados dentro de um grupo de populações (Excoffier et al., 1992).

O parâmetro F_{ST} foi uma das ferramentas utilizadas para se estimar a diversidade entre duas ou mais populações. Os cálculos foram feitos utilizando o método baseado na correlação entre alelos (Weir & Cockerham, 1984). Embora os resultados não sejam exatamente os mesmos, o F_{ST} também pode ser definido em termos probabilidade de identidade por descendência entre pares de alelos (Nei, 1987). Note que este valor de F_{ST} corresponde a uma estimativa da variância intra-populacional, não sendo equivalente ao F_{ST} tradicionalmente utilizado (Weir & Cockerham, 1984; Nei, 1987), apenas as notações coincidem. Em caso de estrutura hierárquica simples (ausência de estrutura hierárquica) de indivíduos haplóides na qual todas as populações pertencem a um único grupo, o componente da variância que quantifica a diferença entre populações do mesmo grupo (F_{SC}) é absolutamente idêntico ao valor de F_{ST} proposto por Weir & Cockerham (1984). Essa análise foi realizada com o auxílio do programa computacional Arlequin v. 2.000 (Schneider et al 2000).

Análise demográfica

A história demográfica das populações é um fator relevante para o entendimento dos padrões filogeográficos, e um fator determinante da estrutura das genealogias gênicas. Desta maneira, a demografia histórica e a genealogia gênica de populações co-específicas são componentes importantes do estudo filogeográfico. A

estrutura de uma árvore gênica de linhagens sobreviventes pode ser fortemente influenciada pela época em que ocorreu a expansão e pela história demográfica anterior e subsequente (Avice, 2000).

A distribuição das diferenças nucleotídicas par a par entre os haplótipos é usada para propiciar um indicador da idade e história da população. Os eventos de crescimento e declínio populacionais afetam esta distribuição, chamada de “*mismatch distribution*” (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992).

Um pico unimodal na distribuição é uma indicação de que a população passou por um evento de expansão. Quanto menor as diferenças médias entre seqüências de tal pico, mais recente foi o crescimento da população. Reciprocamente, picos com diferenças par a par grandes indicam eventos mais antigos. Populações mais velhas mostram uma distribuição multimodal devida não apenas a eventos de expansão da população (em número de indivíduos), mas também devido a existência de subestrutura populacional (Marjoram & Donnelly, 1994).

Os parâmetros demográficos foram avaliados graficamente usando o número de diferenças par a par entre os haplótipos plotado de acordo com suas frequências relativas - *mismatch distribution*, para determinar se as populações sofreram recente expansão (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Uma população que sofreu uma expansão recente apresenta uma distribuição das diferenças par a par entre as seqüências unimodal, sem grandes diferenças na frequência das diferenças par a par, apresentando baixo índice de raggedness (r) (Harpending, 1994). Os padrões observados e esperados foram avaliados separadamente para cada clado estatisticamente significativo resultado da análise de agrupamentos de clados. Foram utilizados os programas computacionais DnaSP v. 4.10 (Rozas et al., 2003), e Arlequin v. 3.0 (Schneider et al., 2005).

3 Resultados

3.1 Estatística Descritiva

Para um total de 175 indivíduos de *Astyanax altiparanae*, provenientes de 36 populações, foram seqüenciadas 805 bases nucleotídicas do gene mitocondrial Citocromo B, correspondendo às posições 34 a 838 do mesmo gene em *A. mexicanus* (GenBank AF287414). Estas seqüências foram lidas e alinhadas com o auxílio dos programas computacionais *Chromas* v. 1.55 (Technelysium, 1998, 2004) e *BioEdit* v. 7.0.4.1 (Hall, 1999), respectivamente. Posteriormente, as seqüências foram submetidas às análises estatísticas descritivas através do programa DnaSP v. 4.10 (Rozas et al, 2005). Foram identificados 92 haplótipos, 112 sítios polimórficos (segregantes – S) e 693 sítios invariáveis; o número total de mutações (h) foi 121; diversidade nucleotídica P_i : 0,00692; número médio de diferenças nucleotídicas (k) k: 5,574.

3.2 Haplótipos

Os 92 haplótipos identificados na amostra foram numerados de 1 a 92. Desses, 71 haplótipos são individuais, ou seja, encontrados em apenas um indivíduo. Os 21 haplótipos restantes estão presentes em mais de um indivíduo. Dentre os haplótipos presentes em mais de um indivíduo, o haplótipo 1 foi o mais freqüente, sendo compartilhado por 54 indivíduos provenientes de 24 populações. As populações coletadas, os respectivos haplótipos observados em cada uma, e o número total de indivíduos de cada população estão listados na Tabela 03. A Figura 07 mostra as populações amostradas com os respectivos haplótipos encontrados em cada uma.

Tabela 03. Populações amostradas, número de cada um dos haplótipos observados e número de indivíduos amostrados por população. No caso de um mesmo haplótipo ter sido encontrado mais de uma vez em uma população, este é precedido do algarismo correspondente ao número de vezes que foi encontrado e do sinal matemático X.

População	Haplótipos	Indivíduos
SJ 1	1, 4, 2X19, 26, 51	6
SJ 2	2X4, 2X10, 12, 27, 28, 49, 77, 92	10
SJ 3	6X1, 24, 42, 76, 78	10
BT 1	9X1, 25	10
BT 2	1, 81	2
BT 3	2	1
BT 4	4X1, 2, 5, 36, 48, 50, 80	10
BT 5	1	1
BT 6	1, 2X5, 41, 47, 70, 74, 79, 91	9
AG 1	4X1, 90	5
AG 2	1, 11, 22, 23, 35	5
AG 3	1	1
AG 4	3, 2X7, 2X16, 20, 82, 85	8
AG 5	1, 2X3, 2X9, 45, 53, 69, 72	9
AG 6	1	1
PE 1	7X1, 4, 12, 44, 61	11
PE 2	2X1, 34	3
PE 3	1	1
PP 1	3X1, 3, 2X21, 32, 33, 43	9
PP 2	1	1
PP 3	2X1, 9	2
MP 1	37	1
MP 2	40, 60	2
MP 3	1, 3X8, 56, 57, 59, 71	8
MP 4	55	1
AP 1	58 75	2
AP 2	83	1
PC 1	1, 13, 18, 46	4
PC 2	1, 2, 11, 18, 38, 52, 62	7
TG 1	9, 13, 15, 84, 87, 88, 89	7
TG 2	1, 2X7, 14, 15, 17, 39	1
TG 3	29, 31, 54, 73	4
TG 4	2X1, 14, 39, 67, 68, 86	7
PG 1	1, 3X6, 64, 65	6
PG 2	63	1
SG 1	66	1

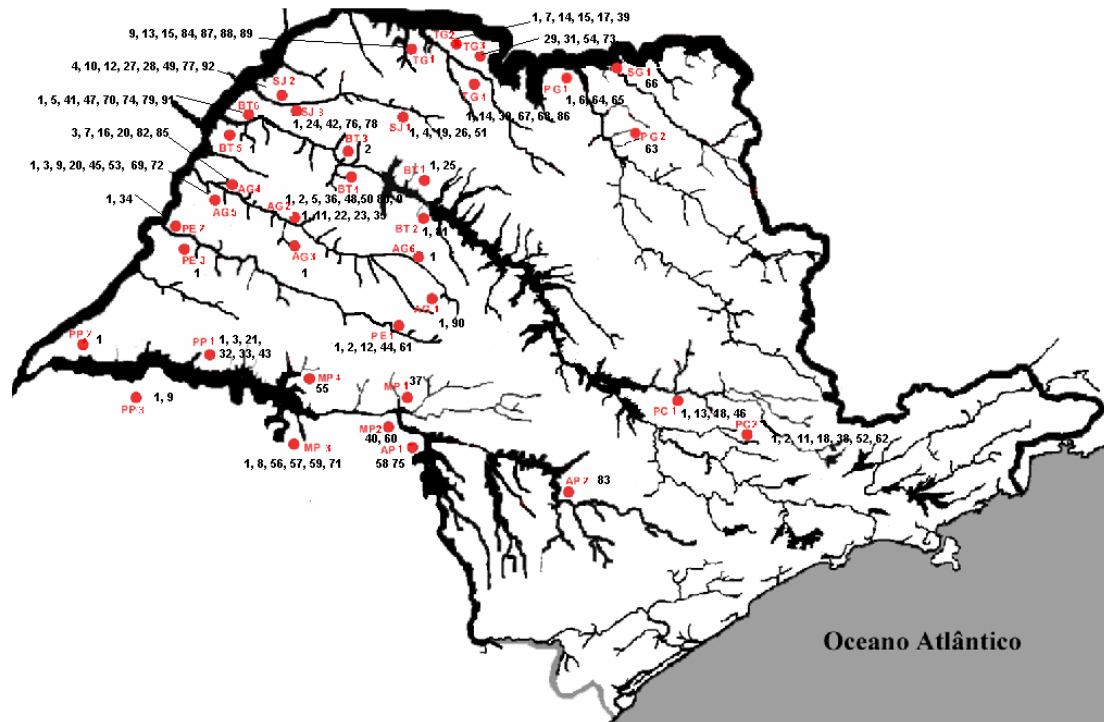


Figura 07. Mapa do estado de São Paulo mostrando as populações amostradas dentro de cada sub-bacia: SJ1, SJ2, SJ3- São José dos Dourados; BT1, BT2, BT3, BT4, BT5, BT6- Baixo Tietê; AG1, AG2, AG3, AG4, AG5, AG6- Aguapeí; PE1, PE2, PE3- Peixe; PP1, PP2, PP3- Pontal do Paranapanema; MP1, MP2, MP3, MP4- Médio Paranapanema; AP1, AP2- Alto Paranapanema; PC1, PC2- Piracicaba-Capivari-Jundiá; TG1, TG2, TG3, TG4 - Turvo-Grande; PG1, PG2- Baixo Pardo Grande; SG1- Sapucaí Grande; e os haplótipos encontrados em cada uma (numerados de 1 a 92).

3.3 Análise Filogeográfica

O Programa TCS v.1.13 (Clement et al., 2000) foi usado para a construção da rede de haplótipos utilizando as 175 seqüências de indivíduos da espécie *A. altiparanae* provenientes de 36 populações. Através da parcimônia estatística (Templeton, 1998), os 92 haplótipos identificados foram conectados, e também os haplótipos intermediários entre os amostrados que não foram observados na amostra (Figura 08).

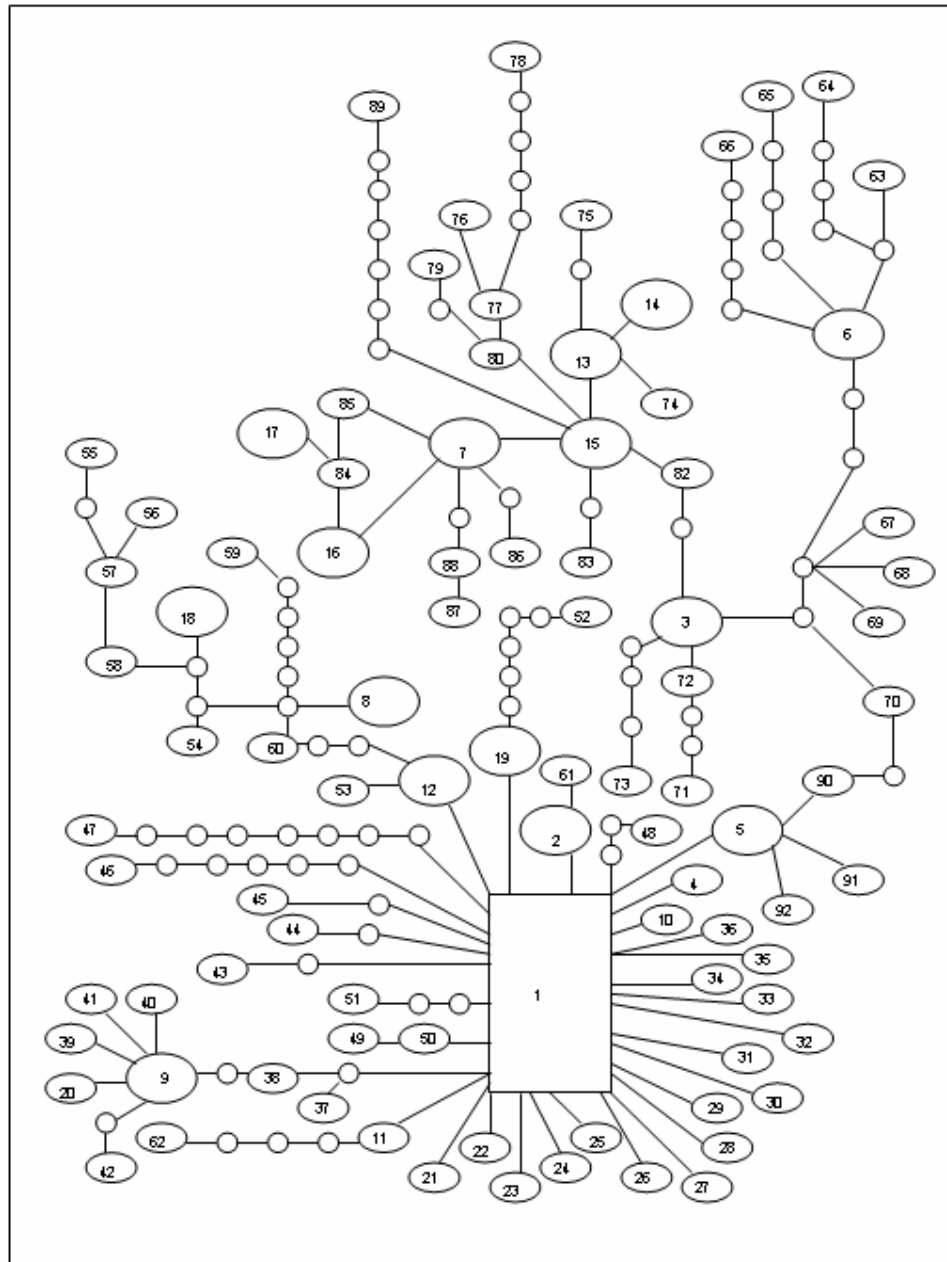


Figura 08. Rede de haplótipos, gerada através do programa computacional TCS 1.13, conectando os 95 haplótipos identificados de indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*. Cada linha corresponde a 01 passo mutacional, cada círculo vazio corresponde a um haplótipo intermediário não encontrado na amostra. O número dentro do círculo corresponde ao número do haplótipo.

A rede de haplótipos obtida foi convertida em uma série de clados agrupados, seguindo a metodologia de Templeton et al. (1987, 1992) e Templeton & Sing (1993). O arranjo dos agrupamentos resultou num total de 90 clados

hierarquicamente arranjados em seis níveis, sendo que os níveis mais abrangentes estão relacionados com tempos evolutivos mais longos. O arranjo foi formado por 50 clados de um passo, 24 clados de dois passos, 9 clados de três passos, 4 clados de quatro passos, e dois clados de cinco passos (Figura 09). A partir desse agrupamento, utilizando o programa computacional Geodis 2.4 (Posada et al., 2000), foi realizada a análise de agrupamento de clados.

A hipótese nula de não associação ao acaso de haplótipos com a distribuição geográfica foi rejeitada para os clados **1-1, 2-14, 2-15, 3-2, 3-4, 3-7, 3-9, 4-1, 4-2, 4-4, 5-1**, e também para clado **6-1**, que é o sexto nível de agrupamento e compreende todos os clados agrupados. A análise de agrupamento de clados detectou, seguindo a chave de Inferência contida em Templeton (2004), as possíveis causas da associação entre haplótipos e distribuição geográfica. Para esses clados, foram realizadas análises demográficas, através da distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos plotada de acordo com suas frequências relativas (*mismatch distribution*), para determinar se essas populações sofreram expansão demográfica recente.

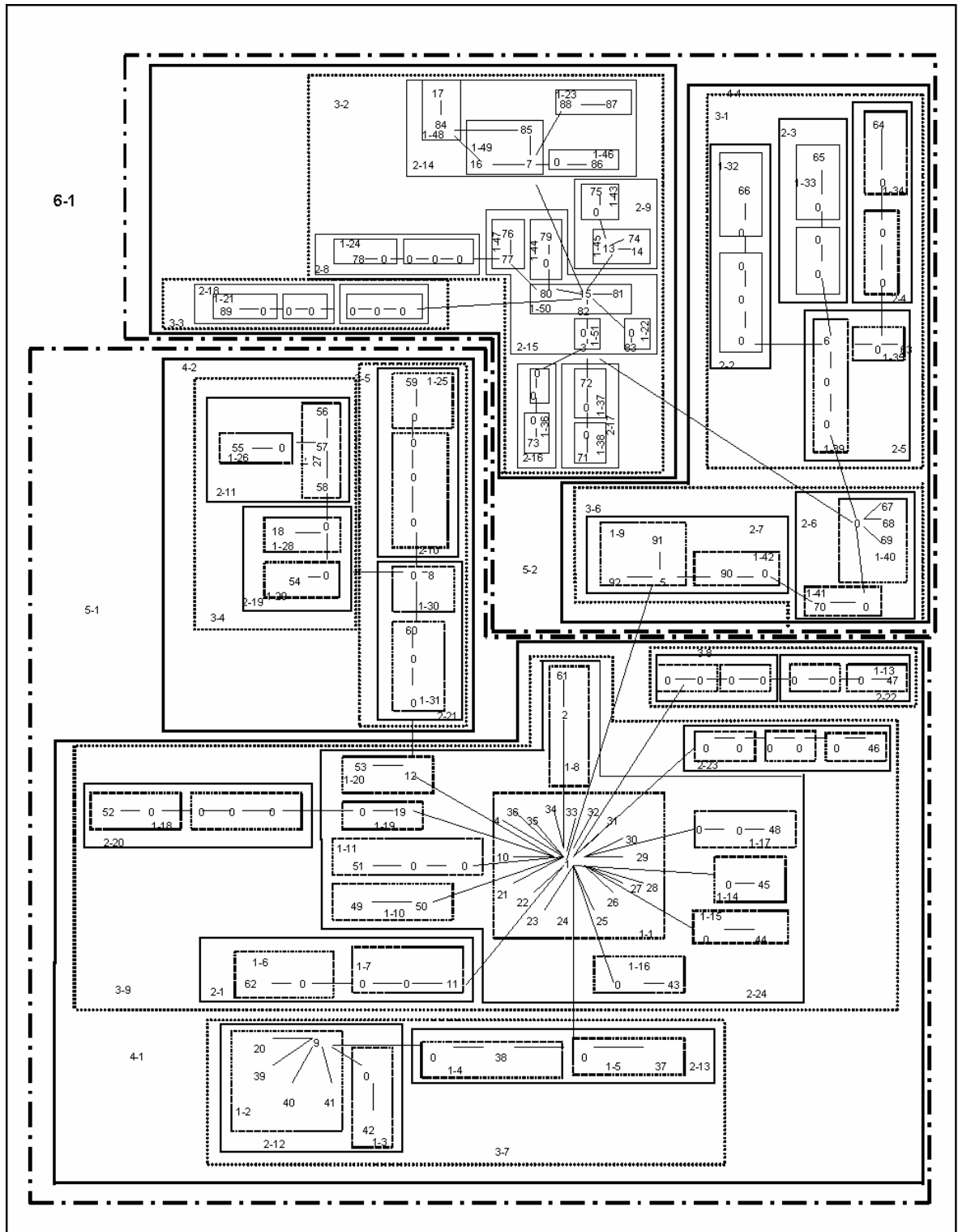


Figura 09. Resultado da análise de agrupamento de clados não enraizados para *Astyanax altiparanae* realizada com 175 seqüências de 805 bases nucleotídicas do gene mitocondrial citocromo B. Cada linha representa um passo mutacional simples. “0” representa um haplótipo que não está presente na amostra.

Clado 1-1:

O clado 1-1 compreende 19 haplótipos. Entre estes, o haplótipo 01 é, provavelmente, a forma ancestral na região amostrada, baseado nas seguintes evidências: a) é o haplótipo mais comum, ocorrendo em 54 indivíduos dos 76 indivíduos agrupados neste clado; b) está amplamente distribuído geograficamente, presente em 24 das 26 populações envolvidas nesse agrupamento; c) é o centro de uma filogenia em forma de estrela (ver Figura 09), cujos ramos conectam, separadamente, por um passo mutacional, os demais haplótipos do clado (haplótipos 04, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36). A Figura 10 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 1-1. As evidências descritas acima incluem esse clado na Categoria V dos padrões filogeográficos descritos por Avise (2000), que é caracterizada principalmente pela presença de linhagens comuns amplamente distribuídas (haplótipo 01), junto a linhagens “privadas” (demais haplótipos do clado), restritas a uma ou poucas populações próximas.

A chave de inferência de Templeton (2004) sugere duas possíveis explicações para a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica, considerando as seguintes premissas: a) a espécie *A. altiparanae* ocorre nas áreas intermediárias entre as populações coletadas, como os rios principais das sub-bacias e também os Rios Paraná e Grande, mas não foram amostradas. Nesse caso, a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica é devida a eventos de isolamento por distância, mas não é possível discriminar entre movimentos a curta distância ou dispersão a longa distância, b) a espécie *A. altiparanae* não ocorre nas áreas intermediárias entre as populações coletadas, e nesse caso, associação dos haplótipos com a distribuição geográfica é devida a fluxo gênico restrito pela distância associado a eventos de dispersão.

No entanto, apesar de para o presente trabalho não terem sido realizadas coletas nas áreas intermediárias, como os rios Paranapanema, Tietê, São José dos Dourados, Aguapeí, do Peixe, Piracicaba, Turvo e Sapucaí, e também no Rio Paraná e no Rio Grande, encontramos na literatura científica referente a *A. altiparanae* informações sobre a ampla ocorrência da espécie na bacia do Alto Rio Paraná, sendo encontrada tanto nas áreas de cabeceiras e riachos, como também nos maiores rios das bacias, tendo sido inclusive relatado que existem diferenças morfológicas entre os indivíduos de populações de riachos e cabeceiras e indivíduos dos canais principais dos maiores rios (Garutti & Britski, 2000; Garutti, 1988 a, 1993; Garutti & Figueiredo-Garutti, 1992).

Considerando então que *A. altiparanae* muito provavelmente ocorra nas áreas intermediárias entre as populações coletadas, como os rios principais das sub-bacias e também os Rios Paraná e Grande, mas que não foram amostradas, podemos considerar que a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica é devida a eventos de isolamento por distância. Porém, devido a lacunas na amostra, não é possível discriminar entre movimentos a curta distância ou dispersão a longa distância.

O resultado obtido com a análise da *Mismatch Distribution* mostra uma curva descendente que está de acordo com o esperado, o que indica que essa população, formada pelos indivíduos que carregam os haplótipos agrupados no clado 1-1, sofreu uma expansão demográfica relativamente recente (Figura 11). Apesar de conter o haplótipo mais antigo, o haplótipo 01, é um clado relativamente recente pois, os haplótipos derivados do haplótipo 01 (haplótipos 04, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36), permanecem localizados em suas áreas de origem, indicando que o tempo foi insuficiente para que se espalhassem geograficamente.

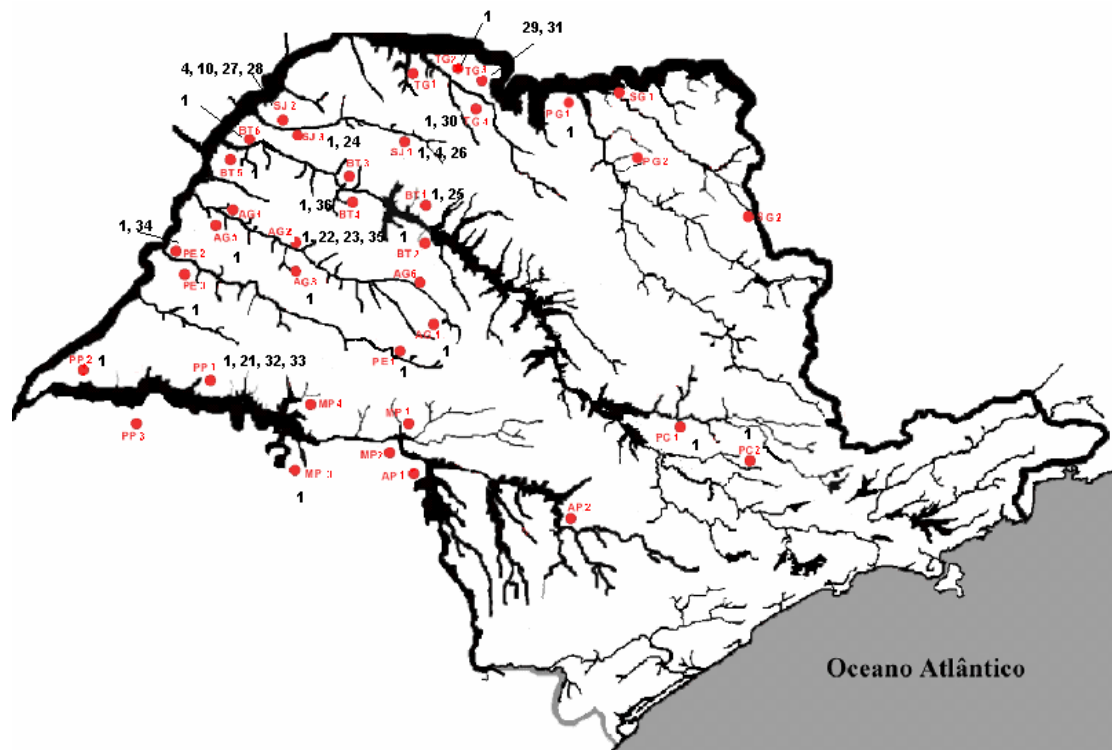


Figura 10. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 1-1.

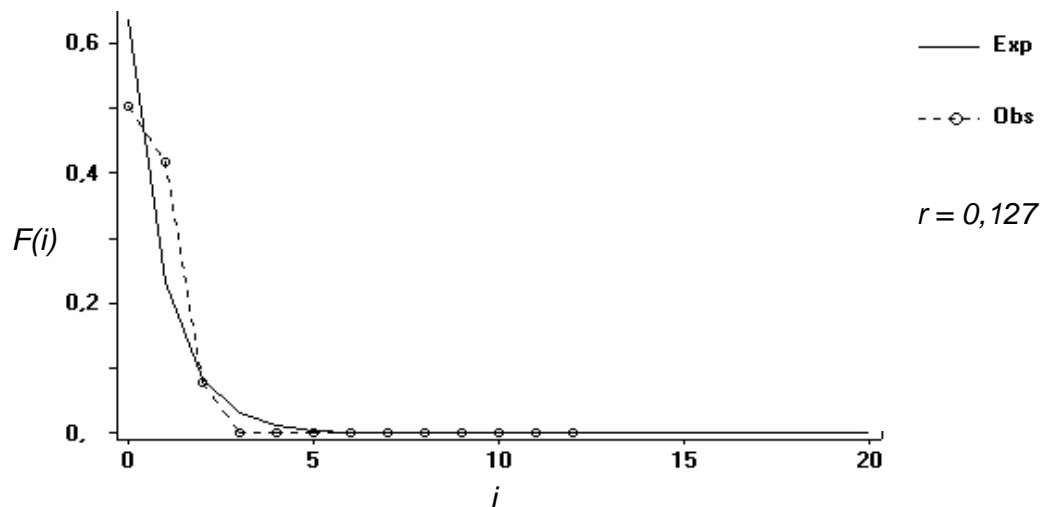


Figura 11. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 1-1. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 2-14

O clado 2-14 compreende os clados, 1-23 (extremidade; haplótipos 87 e 88), 1-46 (extremidade; haplótipo 86), 1-48 (extremidade; haplótipos 17 e 84), e 1-49 (interior; haplótipos 07, 16, e 85), conectados entre si por dois passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 4 populações (AG 4, TG 1, TG 2, TG 4), o que faz com que este clado possua uma localização geograficamente mais restrita. A Figura 12 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 2-14. Os haplótipos incluídos nesses agrupamentos são relativamente mais recentes, já que esse clado está localizado na extremidade da árvore de haplótipos. Dentro desse agrupamento, o haplótipo 07 pode ser considerado o mais antigo, estando distribuído em duas populações (AG 4 e TG 2) e provavelmente é o haplótipo que originou os haplótipos 16 e 85, que estão conectados a ele por um passo mutacional e restritos geograficamente à mesma população (AG 4). Este haplótipo está conectado por dois passos mutacionais ao haplótipo 86, que está restrito a população TG 4, e ao haplótipo 88, restrito a população TG 1, ambas as populações geograficamente próximas à população TG 2. Este padrão de haplótipos proximamente relacionados e geograficamente localizados faz parte da Categoria III dos padrões filogeográficos descritos por Avise (2000). O fluxo gênico contemporâneo é baixo o bastante em relação ao tamanho populacional, havendo assim diversificação das linhagens.

A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva que indica que essa população, formada

pelos haplótipos agrupados no clado 2-14, sofreu uma expansão relativamente recente (Figura 13).

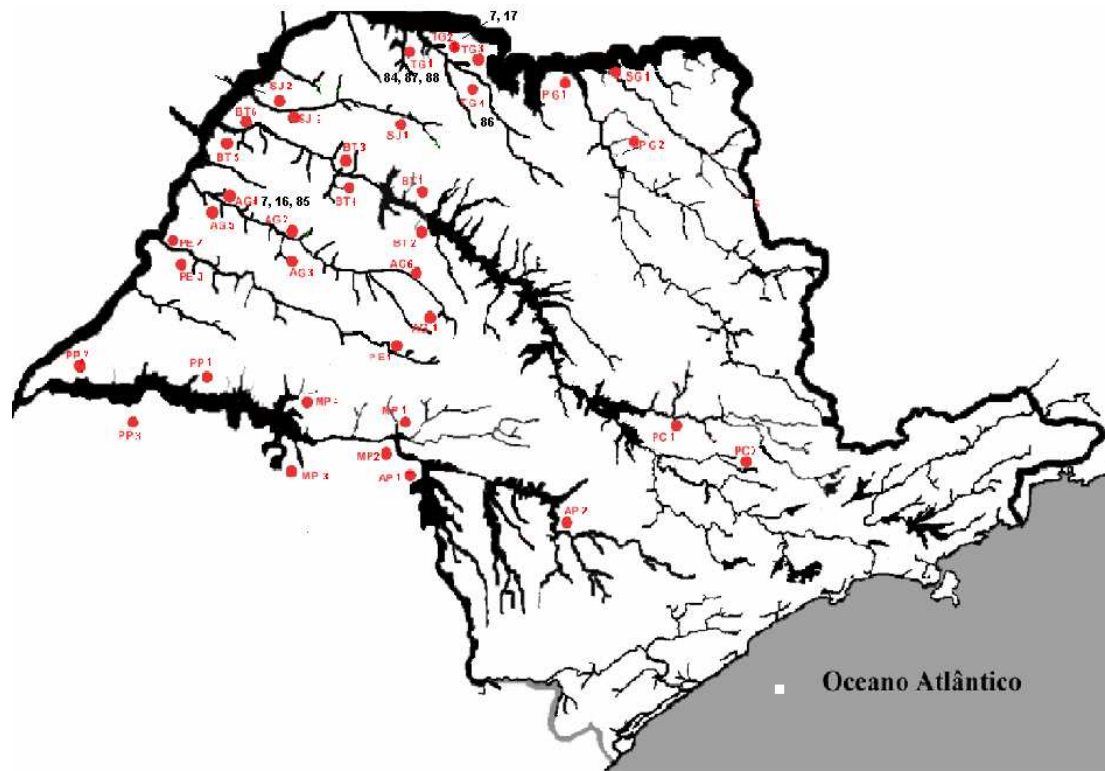


Figura 12. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 2-14.

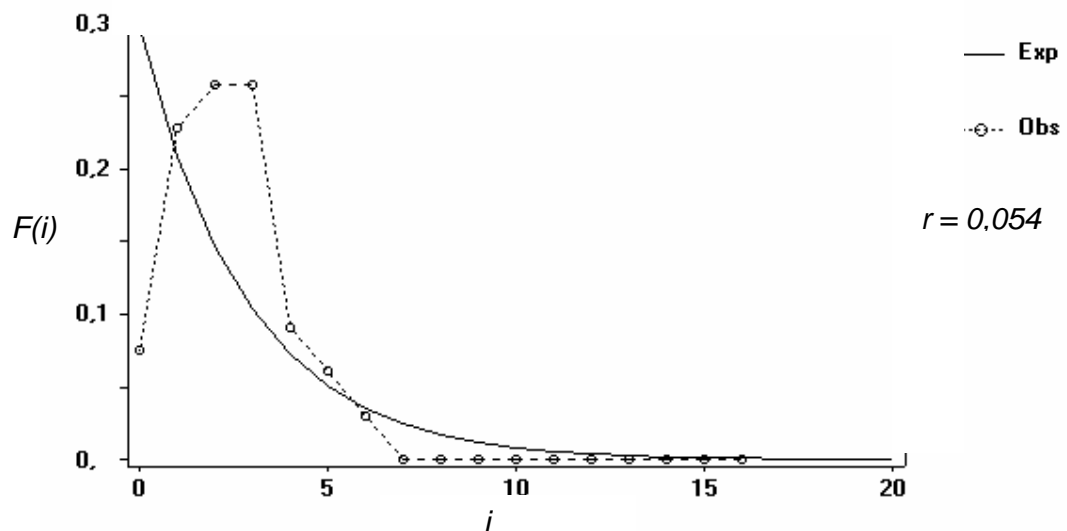


Figura 13. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 2-14. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 2-15

O clado 2-15 compreende os clados 1-51 (interior; haplótipo 03), 1-50 (interior; haplótipos 15, 80, 81, e 82) e 1-47 (interior; haplótipos 76 e 77), 1-44 (extremidade; haplótipo 79), e 1-22 (extremidade; haplótipo 83), conectados entre si por dois passos mutacionais. Neste clado, o haplótipo 03 é provavelmente o mais antigo, pois além de ter uma posição mais interior, é encontrado em três populações (AG 4, AG 5, PP 1). Em relação ao clado 2-14, que é um clado localizado na extremidade do agrupamento total e originado do clado 2-15 (ver figura 09), o clado 2-15 possui uma distribuição geográfica mais ampla com haplótipos distribuídos em 11 populações (SJ 2, SJ 3, BT 2, BT 4, BT 6, AG 4, AG 5, PP 1, AP 2, TG 1, TG 2). A Figura 14 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 2-15. Apesar de ser um agrupamento estatisticamente significativo, ou seja, a hipótese nula de não associação ao acaso de haplótipos com a distribuição geográfica não pode ser rejeitada, a chave de Inferência de Templeton (2004) detectou amostra inadequada para se discriminar entre fragmentação ou isolamento pela distância para explicar a distribuição desse clado. Talvez por ser um clado que contém vários haplótipos intermediários, mas que não foram amostrados.

Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva que foge do modelo esperado de equilíbrio, o que sugere que os haplótipos que formam o clado 2-15 formam uma população que sofreu uma expansão não tão recente (Figura 15), o que está de acordo com a posição interior deste clado na árvore de haplótipos (ver Figura 09).

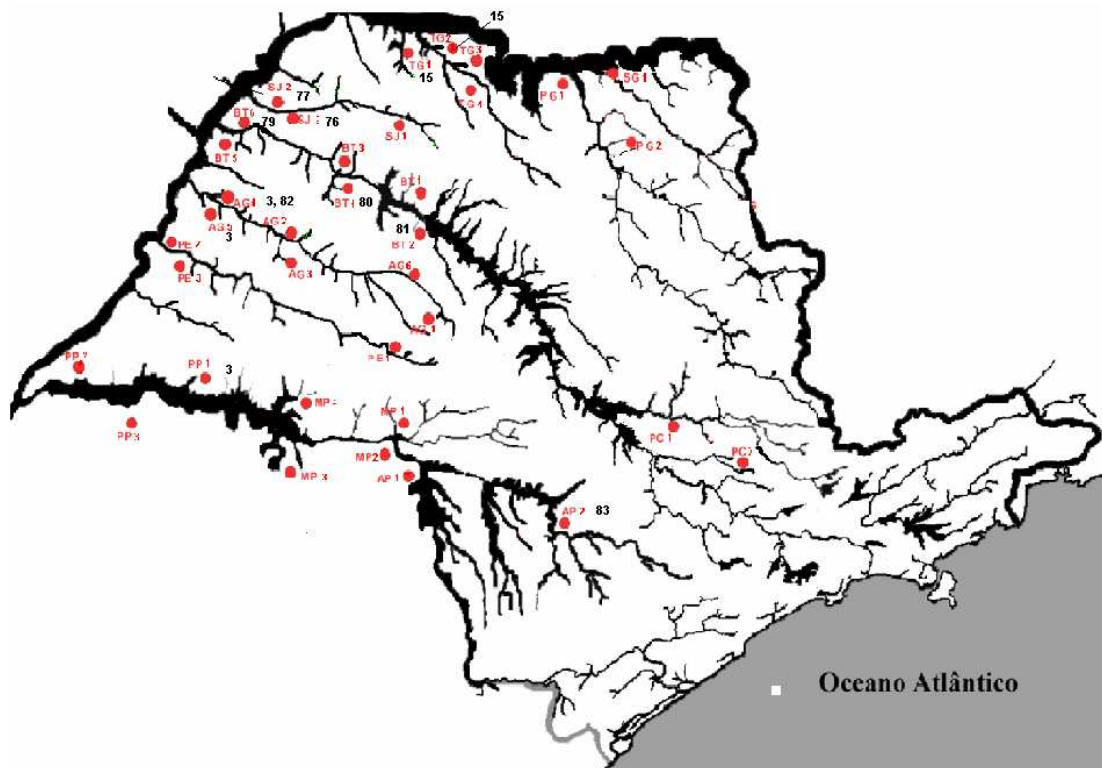


Figura 14. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 2-15.

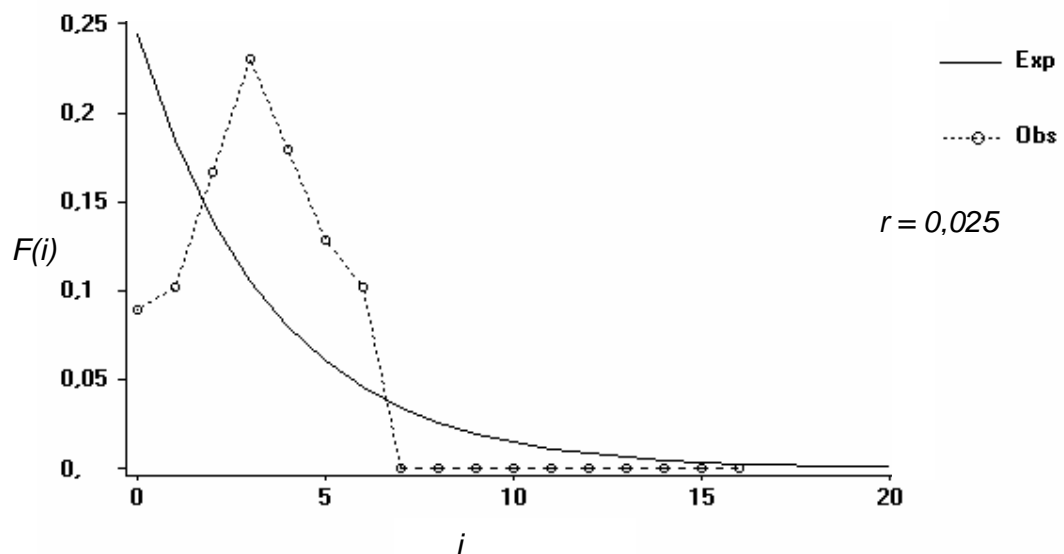


Figura 15. Distribuição das diferenças par a para entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 2-15. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 3-2

O clado 3-2 compreende os clados 2-8 (extremidade; haplótipo 78), 2-9 (extremidade; haplótipos 13, 14, 74 e 75), 2-14 (extremidade; haplótipos 07, 16, 17, 84, 85, 86, 87, 88), 2-15 (interior; haplótipos 03, 15, 76, 77, 79, 80, 81, 82, e 83), 2-16 (extremidade; haplótipo 73), e clado 2-17 (extremidade; haplótipos 71 e 72) conectados entre si por três passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 16 populações (SJ 2, SJ 3, BT 2, BT 4, BT 6, AG 4, AG 5, PP 1, MP 3, AP 1, AP 2, PC 1, TG 1, TG 2, TG 3, TG 4), o que faz com que este clado seja amplamente distribuído geograficamente. A Figura 16 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 3-2. Os dois clados mais importantes que formam o clado 3-2 são os clados 2-14 (extremidade, mais localizado geograficamente) e 2-15 (interior, mais espalhado geograficamente), pois estes dois clados foram estatisticamente significantes no nível de agrupamento anterior, ou seja, clados de dois passos. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado sugere que os haplótipos que formam o clado 3-2 formam uma população que sofreu uma expansão (Figura 17).

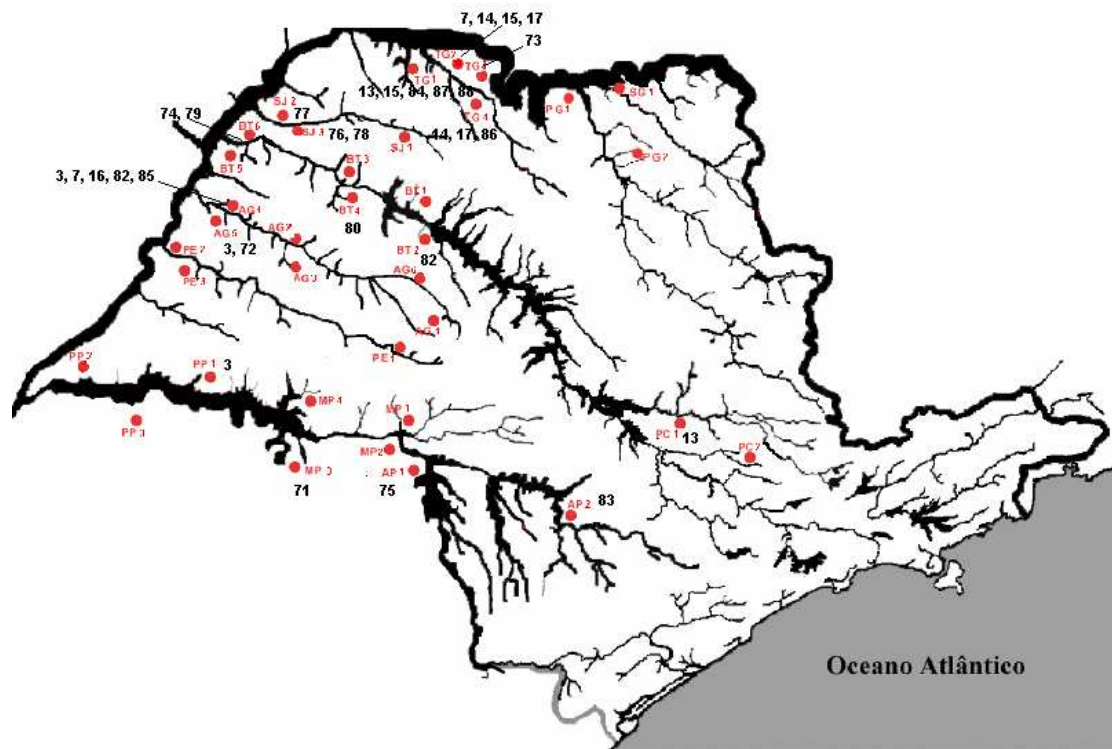


Figura 16. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 3-2.

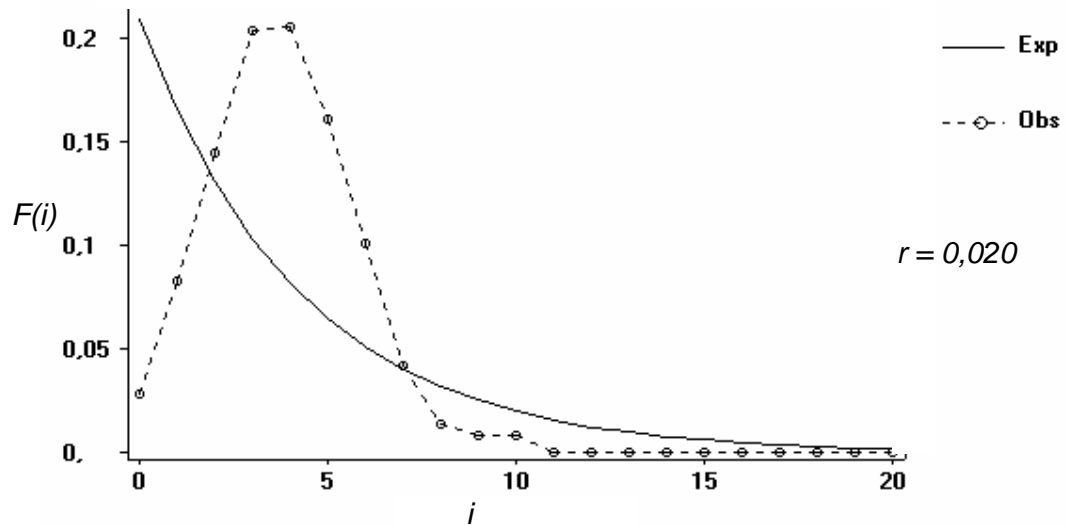


Figura 17. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 3-2. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 3-4

O clado 3-4 compreende os cladogramas 2-11 (extremidade; haplótipos 55, 56, 57, e 58) e 2-19 (interior; haplótipos 18 e 54), conectados entre si por três passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 6 populações (AP 1, MP 3, MP4, PC 1, PC 2, TG 3). É um clado localizado na extremidade da rede de haplótipos, sendo os haplótipos, portanto, relativamente recentes. Os cladogramas 2-11 e 2-19 estão distribuídos geograficamente em populações distantes. A Figura 18 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 3-4. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de fluxo gênico restrito pela distância incluindo um evento antigo de dispersão a longa distância. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado reflete, através dos dois picos encontrados, dois conjuntos de haplótipos com haplótipos conectados por vários passos mutacionais, indicando dois eventos de expansão demográfica subsequentes, um originando o clado 2-19 (interior, mais antigo), e a partir deste clado, outro evento de expansão demográfica originando o clado 2-11 (extremidade, mais recente) (Figura 19).

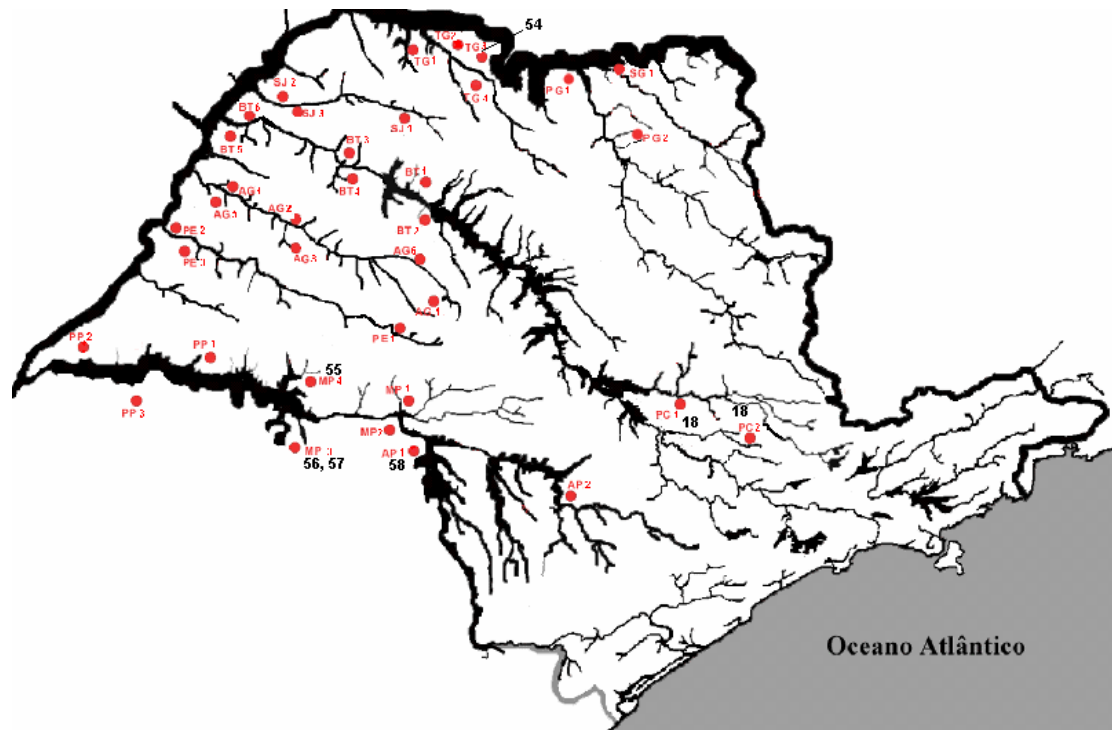


Figura 18. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 3-4.

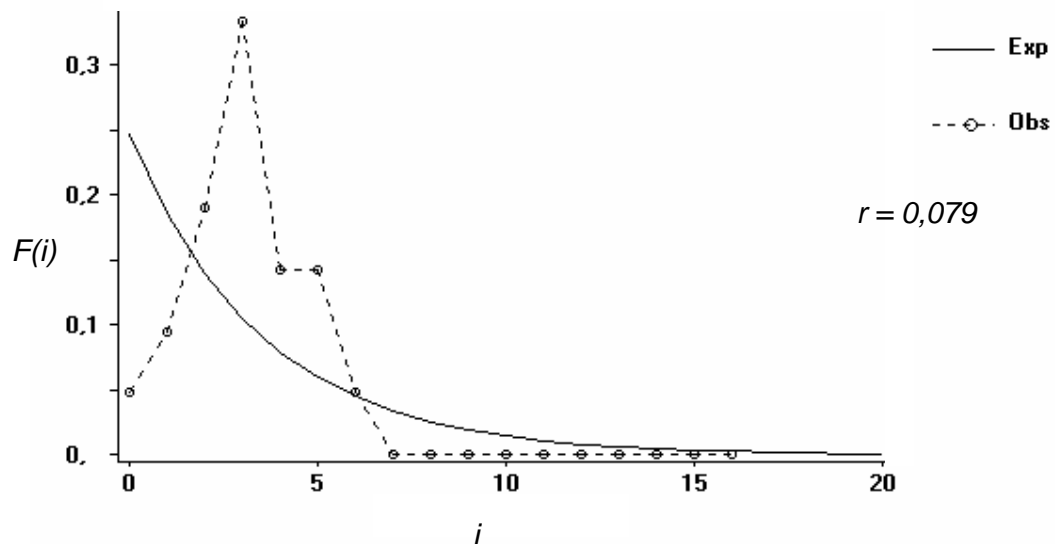


Figura 19. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 3-4. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 3-7

O clado 3-7 compreende os clados 2-12 (extremidade; haplótipos 9, 20, 39, 40, 41, e 42) e 2-13 (interior; haplótipos 37 e 38), conectados entre si por três passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 10 populações (SJ 3, BT 6, AG 4, AG 5, PP 3, MP 1, MP 2, PC 2, TG 1, TG 2). A Figura 20 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 3-7. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância associado a dispersão a longa distância. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, o resultado reflete, através dos dois picos encontrados (Figura 21), uma expansão demográfica originando dois conjuntos de haplótipos. O pico maior representa o clado 2-12 (extremidade), que apresenta alta frequência relativa de poucas diferenças par a par, ou seja, os haplótipos localizados na extremidade 20, 39, 40, e 41 conectados, separadamente, ao haplótipo 9 (interior), por um passo mutacional, e o haplótipo 42 (extremidade), conectado ao haplótipo 9 por dois passos mutacionais. O pico menor representa o clado 2-13, mostrando uma baixa frequência relativa das maiores diferenças par a par, ou seja, poucos haplótipos apresentando mais diferenças entre eles (haplótipos 37, 38, e dois haplótipos intermediários). Os dois picos sugerem dois eventos de expansão demográfica subsequentes, um originando o clado 2-13 (interior, mais antigo), e a partir deste, outro evento de expansão demográfica originando o clado 2-12 (extremidade, mais recente).

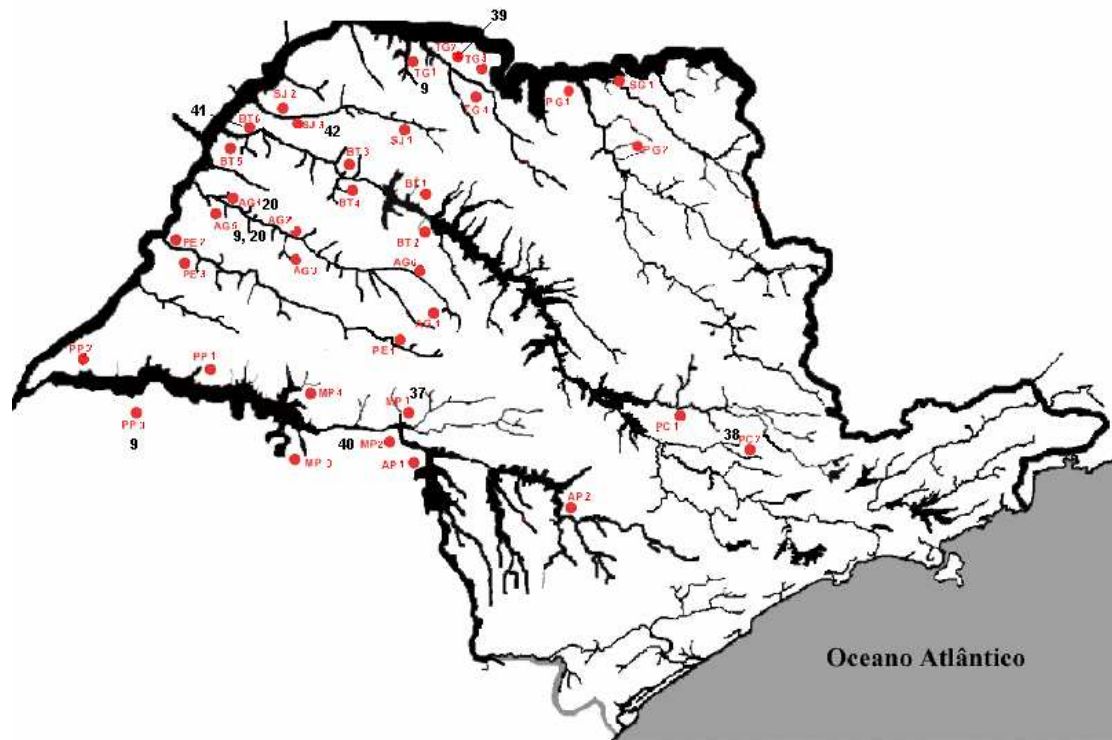


Figura 20. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 3-7.

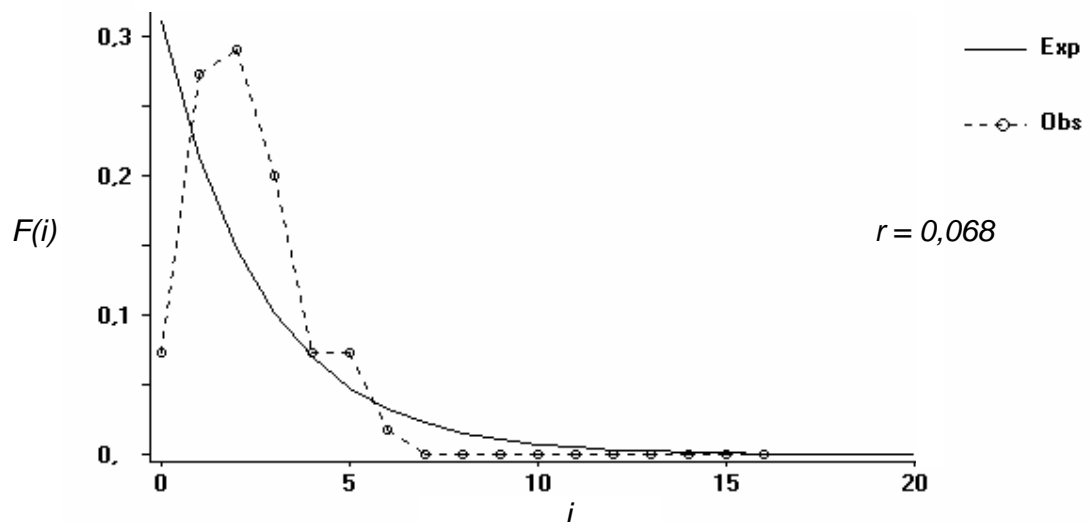


Figura 21. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 3-7. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 3-9

O clado 3-9 compreende os clados 2-1 (extremidade; haplótipos 11 e 62), 2-20 (extremidade; haplótipo 52), 2-23 (extremidade; haplótipo 46), e 2-24 (interior; haplótipos, 01, 04, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 12, 53, 19, 51, 49, 50, 02, 61, 43, 44, 45, 48), conectados entre si por três passos mutacionais. É um clado que apresenta ampla distribuição geográfica, com haplótipos distribuídos em 27 populações (SJ 1, SJ 2, SJ 3, BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6, AG 1, AG 2, AG 3, AG 5, AG 6, PE 1, PE 2, PE 3, PP 1, PP 2, PP 3, MP 3, PC 1, PC 2, TG 2, TG 3, TG 4, PG 1). Dentre os clados que formam o clado 3-9, o clado 1-1 é o mais importante, pois contém o haplótipo ancestral (haplótipo 01). Os demais clados são todos derivados do haplótipo 01 (ver figura 09). A Figura 22 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 3-9. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de expansão da área de ocorrência. O haplótipo 01, considerado o haplótipo ancestral, provavelmente sofreu uma expansão passada da área de ocorrência, ficando amplamente distribuído geograficamente. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado sugere que os haplótipos que formam o clado 3-9 formam uma população que se expandiu através do surgimento de novos haplótipos derivados do haplótipo 01 (Figura 23).

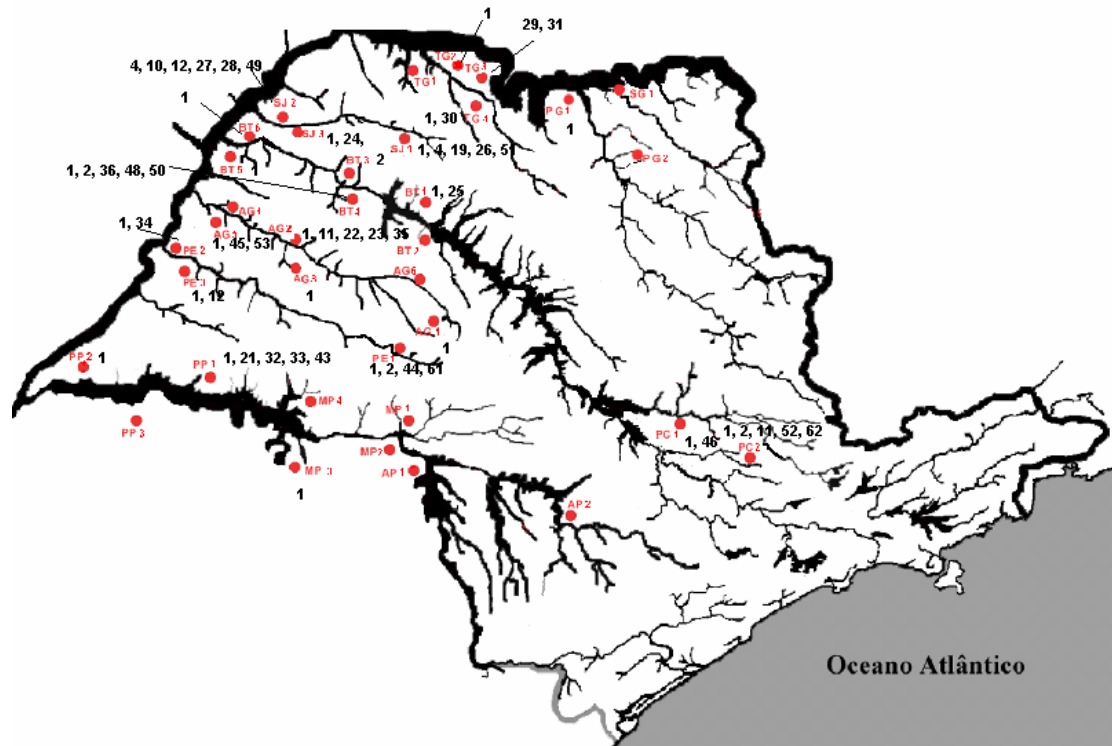


Figura 22. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 3-9.

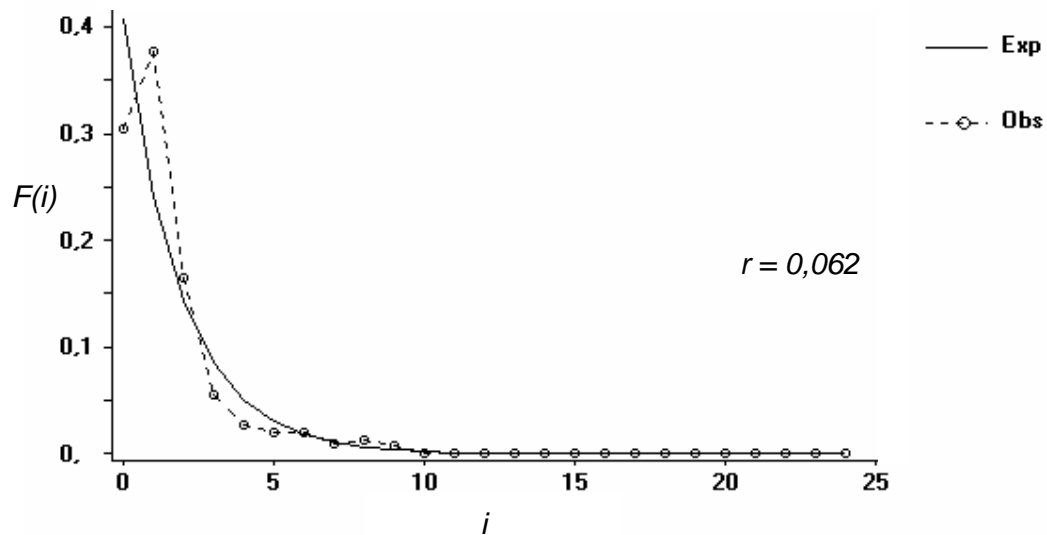


Figura 23. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 3-9. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 4-1

O clado 4-1 é formado pelos clados 3-7 (extremidade; haplótipos 37, 38, 09, 20, 39, 40, 40, e 42), 3-8 (extremidade; haplótipo 47) e 3-9 (interior; haplótipos 11, 62, 52, 46, 01, 04, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 12, 53, 19, 51, 49, 50, 02, 61, 43, 44, 45, e 48), conectados entre si por quatro passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 30 populações (SJ 1, SJ 2, SJ 3, BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6, AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, PE 1, PE 2, PE 3, PP 1, PP 2, PP 3, MP 1, MP 2, MP 3, PC 1, PC 2, TG 1, TG 2, TG 4, PG 1). A Figura 24 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 4-1. A chave de Inferência de Templeton (2004) não foi capaz de detectar as possíveis razões da associação dos haplótipos com a distribuição geográfica, sendo os resultados para esse clado, não conclusivos. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado sugere que os haplótipos que formam o clado 4-1 formam uma população que sofreu uma expansão recente. Considerando que o clado 4-1 abrange o clado 3-9, acima descrito, e dois outros clados menores, podemos inferir que essa expansão recente também está relacionada com o surgimento de novos haplótipos derivados do haplótipo 01 já que a distribuição das diferenças par a par é muito semelhante a do clado 3-9 (Figura 25).

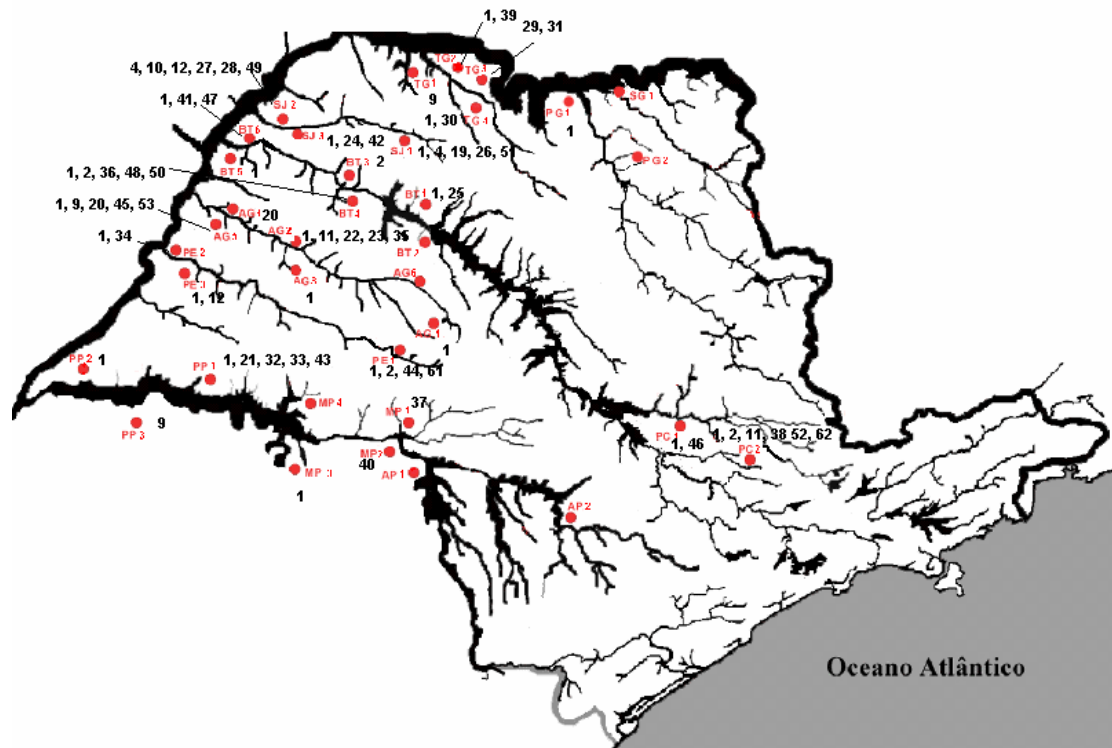


Figura 24. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 4-1.

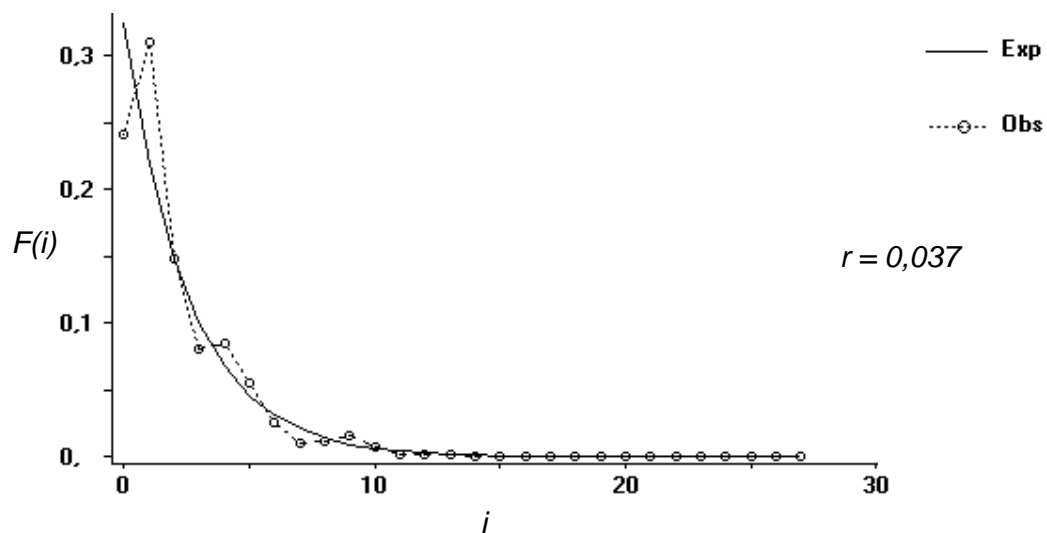


Figura 25. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 4-1. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 4-2

O clado 4-2 compreende os clados 3-4 (extremidade; haplótipos 18, 54, 55, 56, 57, 58) e 3-5 (interior; haplótipos 08, 59, 60), conectados entre si por quatro passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 7 populações (MP 2, MP 3, MP4, AP 1, PC 1, PC 2, TG 3). Com exceção do haplótipo 54, todos os outros haplótipos agrupados neste clado possuem localização geográfica mais ao sul do estado de São Paulo. A Figura 26 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 4-2. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos de fluxo gênico restrito pela distância incluindo dispersão a longa distância. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva com quatro picos (Figura 27), indicando diferentes frequências relativas das diferenças par a par, o que reflete o grande número de passos mutacionais envolvido neste agrupamento. Este resultado sugere ainda, que os haplótipos que formam o clado 4-2, são resultados de vários eventos subsequentes de expansões demográficas.

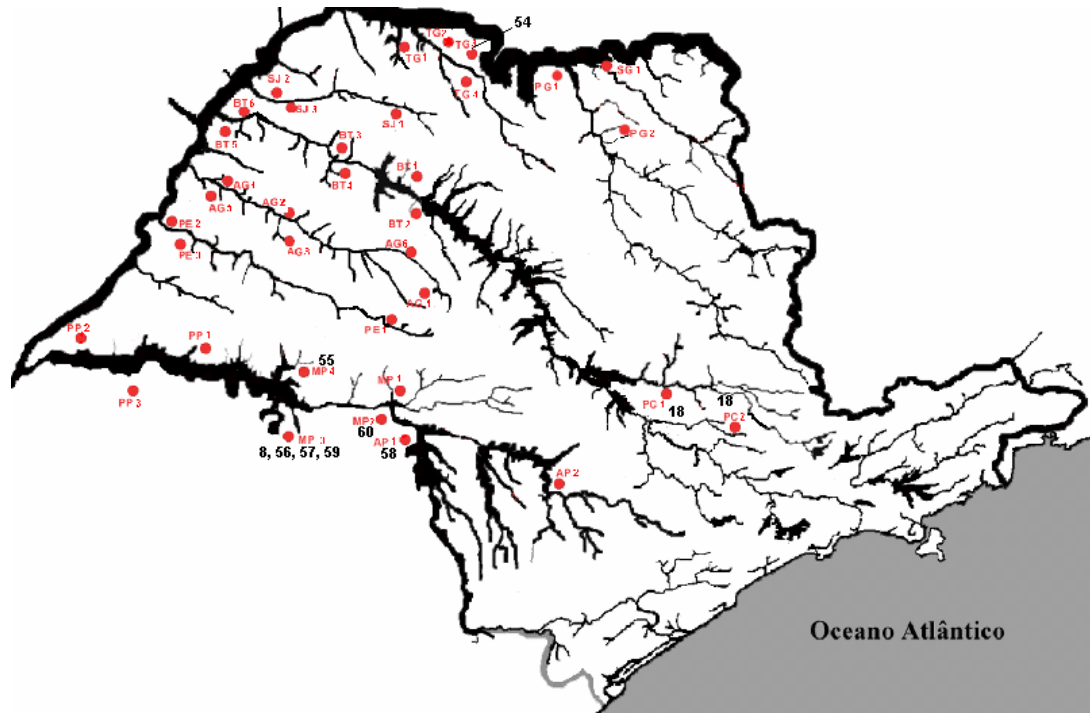


Figura 26. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 4-2.

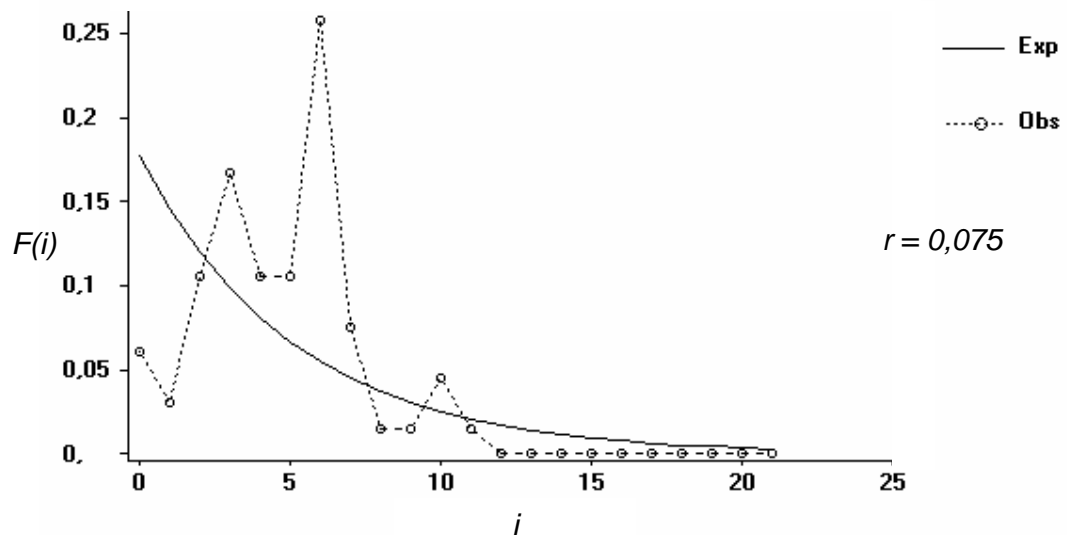


Figura 27. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 4-2. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 4-4

O clado 4-4 compreende os clados 3-1 (extremidade; haplótipos 06, 63, 64, 65, e 66) e 3-6 (interior; haplótipos 05, 90, 91, 92, 67, 68, 69, e 70) conectados entre si por quatro passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 9 populações (SJ 2, BT 4, BT 6, AG 1, AG 5, TG 4, PG 1, PG 2, SG 1). A Figura 28 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 4-4. Através da Figura 28 podemos verificar que todos os haplótipos agrupados no clado 3-1 estão localizados geograficamente nas sub-bacias do Pardo-Grande e Sapucaí-Grande, em áreas próximas, e ambas na região nordeste do estado de São Paulo. Os haplótipos agrupados no clado 3-6 possuem uma distribuição geográfica envolvendo as regiões centro-oeste e noroeste do estado de São Paulo. A chave de inferência de Templeton (2004) sugere duas possíveis explicações para a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica, considerando as seguintes premissas: a) a espécie *A. altiparanae* está ausente nas áreas não amostradas. Nesse caso, a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica é devida a eventos fragmentação alopátrica, b) a espécie *A. altiparanae* não está ausente nas áreas não amostradas, e nesse caso, a amostra geográfica é inadequada para se discriminar entre eventos de fragmentação e isolamento pela distância.

Considerando que *A. altiparanae* ocorre nas áreas não amostradas, como os rios principais das sub-bacias e também os Rios Paraná e Grande, podemos considerar que amostra geográfica é inadequada para se discriminar entre eventos de fragmentação e isolamento pela distância. No entanto, é notório que existe uma separação geográfica entre esses dois clados, o que faz com que a estrutura genética seja entre as duas regiões

(centro-oeste/noroeste e nordeste) contendo mais de uma sub-bacia cada uma, e não entre sub-bacias.

Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva com vários picos (Figura 29), indicando diferentes frequências relativas das diferenças par a par, o que reflete o grande número de passos mutacionais envolvido neste agrupamento. Este resultado sugere ainda, que os haplótipos que formam o clado 4-4, são resultados de vários eventos subsequentes de expansões demográficas.

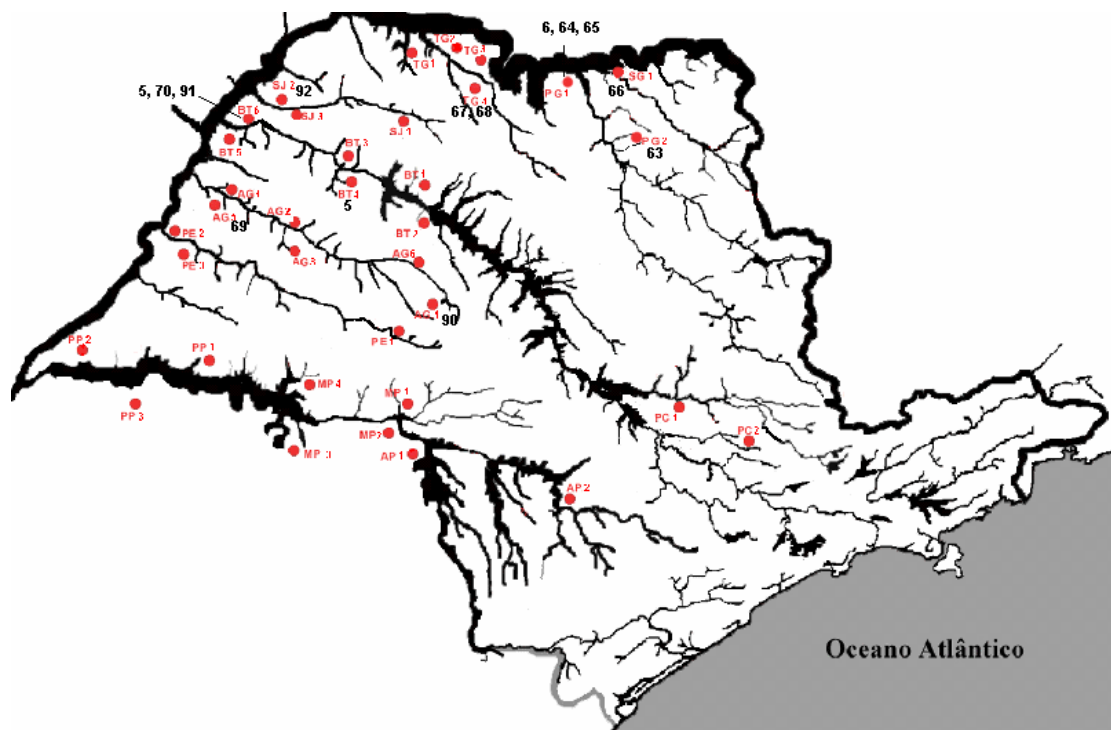


Figura 28. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 4-4.

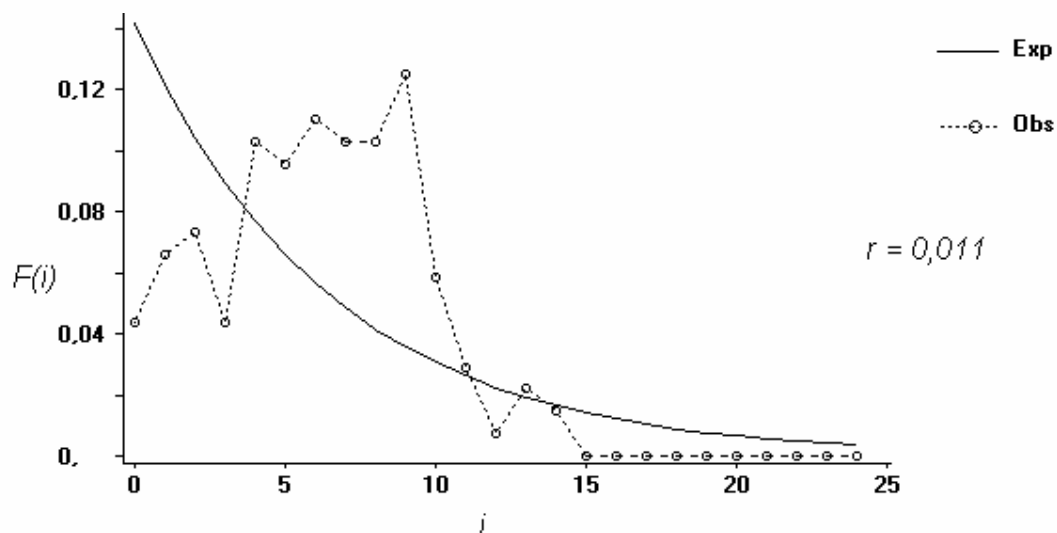


Figura 29. Distribuição das diferenças par a para entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 4-4. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 5-1

O clado 5-1 compreende os clados 4-1 (interior; haplótipos 37, 38, 09, 20, 39, 40, 40, 42, 47, 11, 62, 52, 46, 01, 04, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 12, 53, 19, 51, 49, 50, 02, 61, 43, 44, 45, e 48) e 4-2 (extremidade; haplótipos 18, 54, 55, 56, 57, 5, 08, 59, 60), conectados entre si por cinco passos mutacionais e com haplótipos distribuídos em 33 populações (SJ 1, SJ 2, SJ 3, BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6, AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, PE 1, PE 2, PE 3, PP 1, PP 2, PP 3, MP 1, MP 2, MP 3, MP 4, AP 1, PC 1, PC 2, TG 1, TG 2, TG 3, TG 4, PG 1). A Figura 30 mostra a distribuição geográfica dos haplótipos agrupados no clado 5-1. Através da Figura 30, podemos notar que os haplótipos agrupados neste clado estão presentes em praticamente todas as sub-bacias amostradas. Não são encontrados haplótipos, com exceção do haplótipo 01, nas sub-bacias do Pardo-Grande e Sapucaí-Grande. A chave de Inferência de Templeton (2004) detectou para esse clado, eventos

de expansão contígua da área. Os parâmetros demográficos para esse clado foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva descendente com três picos (Figura 31), que provavelmente reflete os três agrupamentos principais do clado 5-1 (clados 3-4, 3-7 e 3-9). Este resultado sugere que os haplótipos que formam o clado 5-1 formam uma população que sofreu expansões demográficas em tempos distintos, mas primordialmente partir do haplótipo 01.

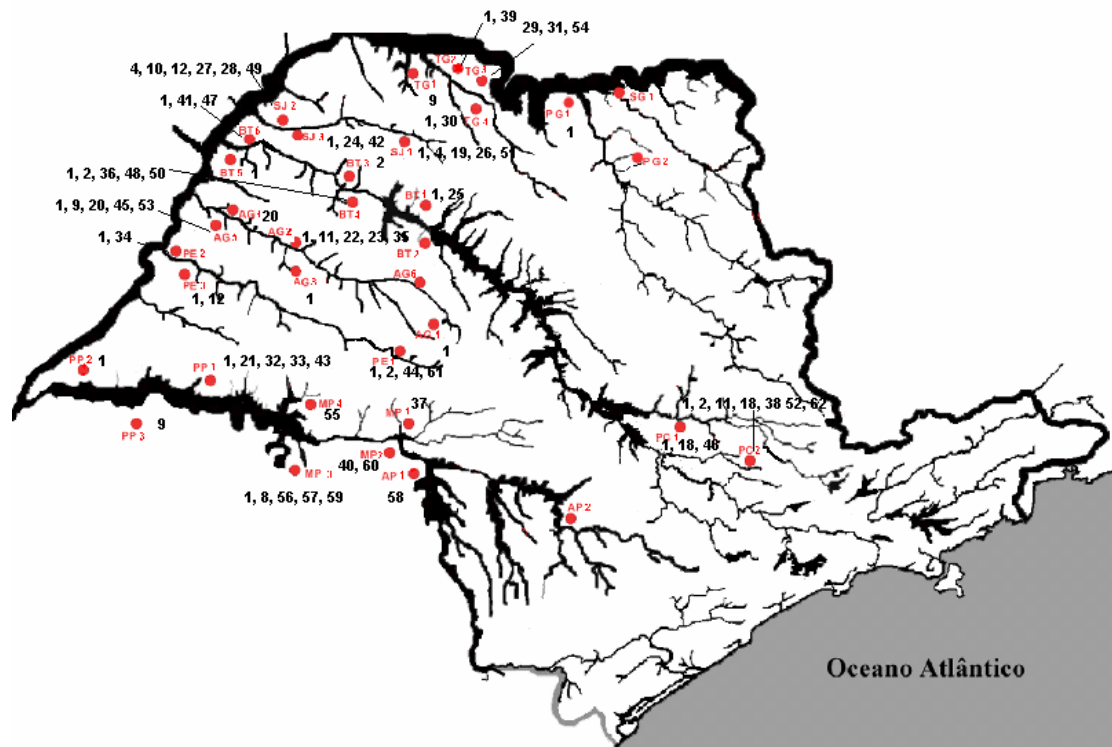


Figura 30. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 5-1.

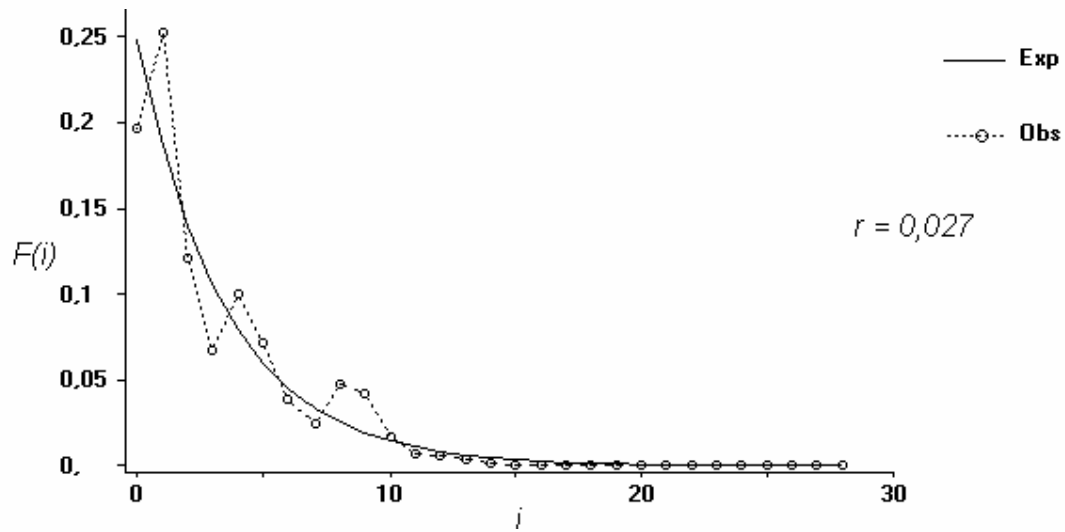


Figura 31. Distribuição das diferenças par a para entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população formada pelo agrupamento do Clado 5-1. i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Raggedness (r).

Clado 6-1 – Agrupamento completo

O clado 6-1 é formado por todos os níveis de agrupamento anteriores, separados em dois cladogramas principais, o clado 5-1 e o clado 5-2. Nesse caso, não existe o contraste entre extremidade e interior, e agrupa a totalidade de haplótipos e populações geográficas. Conforme pode ser observado na Figura 32, não existe uma separação geográfica entre os dois cladogramas, ambos agrupam haplótipos em populações coincidentes ou próximas. Na Figura 33, os haplótipos agrupados tanto no clado 5-1, como no clado 5-2 estão posicionados junto à população onde foram encontrados, porém, como em alguns casos existe coincidência de populações, para diferenciá-los, os haplótipos do clado 5-2 estão delimitados por elipses. O resultado da análise de agrupamentos de cladogramas para esse último nível hierárquico de agrupamento resultou, através da Chave de Inferência de Templeton (2004), em eventos de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância. A análise da estrutura dentro de cada clado separadamente mostra que é

possível a combinação de estrutura populacional e fatores históricos oferecendo um maior poder para explicar a rede de haplótipos. Assim, no presente trabalho foram detectados cinco eventos de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância (clados 1-1, 2-14, 3-2, 5-1, 6-1), dois eventos de fluxo gênico restrito associados com dispersão à longa distância (clados 3-4 e 3-7), um evento de expansão da área de ocorrência (clado 3-9), dois clados nos quais as amostras geográficas são inadequadas para se discriminar entre eventos de fragmentação e isolamento pela distância (clados 2-15 e 4-4) e um clado cujo resultado não foi conclusivo (clado 4-1).

Os parâmetros demográficos para esse clado, composto pela totalidade de haplótipos, foram inferidos através da análise da *Mismatch Distribution*, e o resultado mostra uma curva com três picos (Figura 33), que provavelmente reflete os tempos distintos em que se deram as expansões demográficas que formaram os diversos clados incluídos neste agrupamento geral.

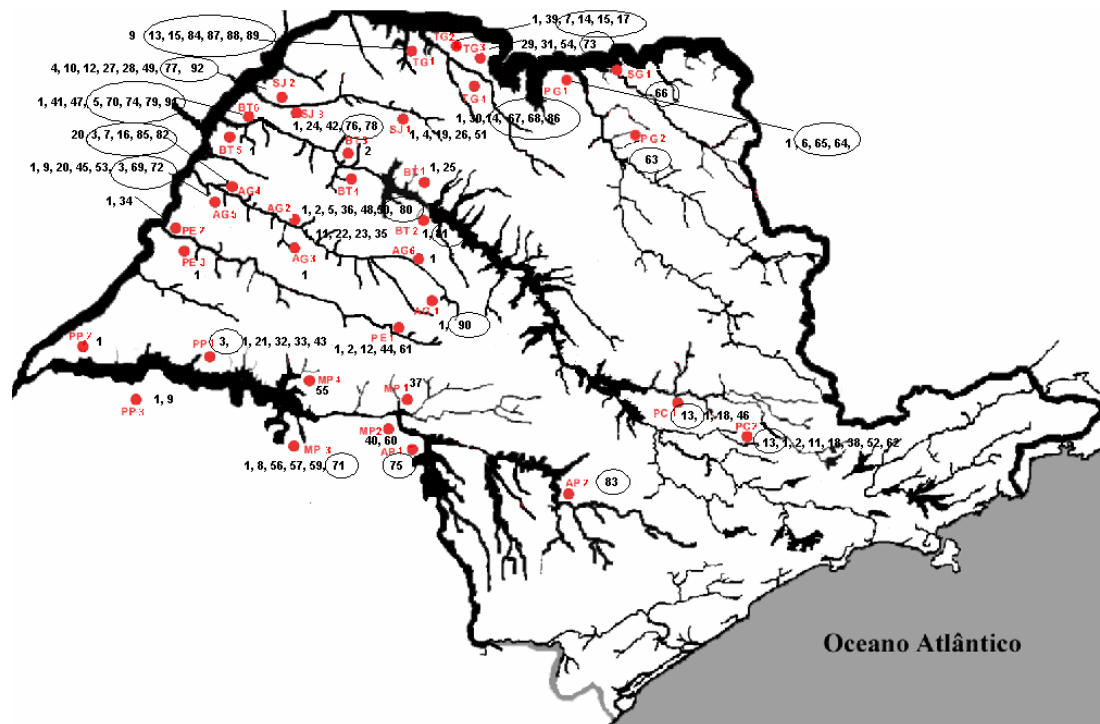


Figura 32. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as populações amostradas e a distribuição dos haplótipos presentes no clado 6-1, formado pelos cladogramas 5-1 e 5-2. Os haplótipos delimitados por elipses são aqueles agrupados no clado 5-2.

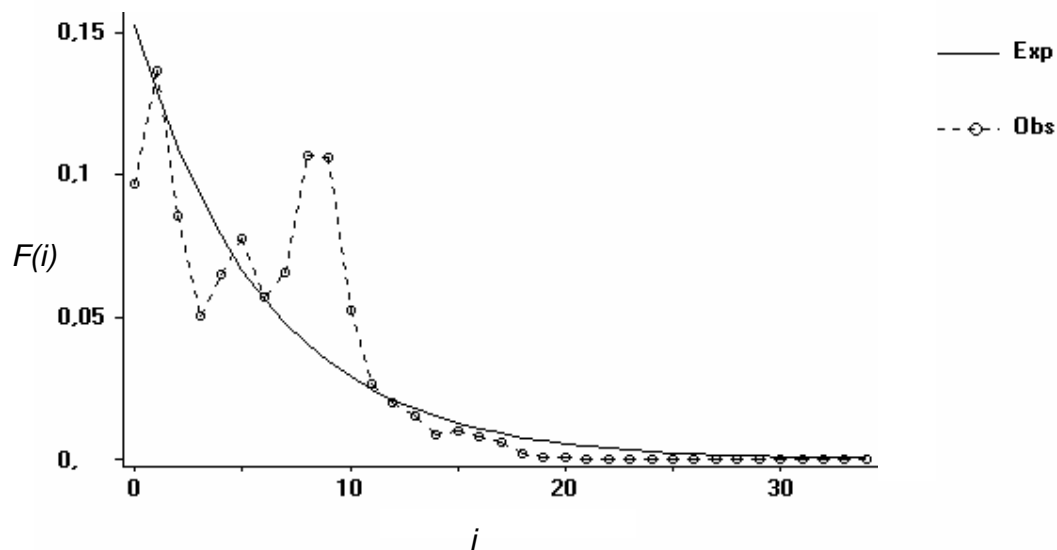


Figura 33. Distribuição das diferenças par a par entre os haplótipos do gene mitocondrial Citocromo B para a população da porção paulista do Alto Paraná (todas as populações). i corresponde ao número de diferenças entre os haplótipos. $F(i)$ é a frequência relativa dos haplótipos que apresentam as diferenças. É mostrado o índice de Ruggedness (r).

3.4 Análise da Variância Molecular

Os resultados da análise de agrupamento de clados foram contrastados com os resultados da Análise da Variância Molecular (AMOVA). Inicialmente, como controle, foi testada uma estrutura hierárquica simples (ausência de estrutura) na qual as 36 populações fazem parte de um mesmo grupo. Este teste (ausência de estrutura) proporciona uma estimativa geral da diferenciação das populações analisadas na espécie, e apresentou um valor de $\Phi_{ST} = 0,0$. Valores de Φ entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada; 0,15 a 0,25 indicam diferenciação genética grande; e acima de 0,25 indicam diferenciação genética muito grande (Wright, 1978). Este resultado mostra que a variação não pode ser atribuída às diferenças entre as populações.

Outros dois modelos foram testados, utilizando diferentes critérios de agrupamento.

O segundo critério de agrupamento consistiu em agrupar as populações amostradas em grupos formados pelas sub-bacias as quais as populações pertencem. O objetivo de utilizar esse critério de agrupamento foi testar se existe estrutura populacional entre os grupos (Φ_{CT}) entre as populações (Φ_{SC}), e dentro das populações nas sub-bacias (Φ_{ST}) conforme está listado abaixo:

- População 01: Sub-bacia do rio São José dos Dourados (SJ)
- População 02: Sub-bacia do baixo Tietê (BT)
- População 03: Sub-bacia do rio Aguapeí (AG)
- População 04: Sub-bacia do Rio do Peixe (PE)
- População 05: Sub-bacia do Pontal do Paranapanema (PP),
- População 06: Sub-bacia do Médio Paranapanema (MP)

- População 07: Sub-bacia do Alto Paranapanema (AP)
- População 08: Sub-bacia dos rios Piracicaba-Capivari-Jundiá (PC)
- População 09: Sub-bacia do Turvo-Grande (TG)
- População 10: Sub-bacia do baixo Pardo-Grande (PG) e Sub-bacia do Sapucaí-Grande (SG)

Este teste, separando as populações em 10 grupos (10 populações) mostrou que 27% da variação presente é atribuída a diferenças dentro das populações, 17% para as diferenças entre as populações e 12% devido às diferenças entre as populações dentro das populações ($\Phi_{ST} = 0,27$, $\Phi_{CT} = 0,17$, $\Phi_{SC} = 0,12$), respectivamente. Ou seja, o alto valor de Φ_{ST} encontrado ($\Phi_{ST} = 0,27$) indica que dentro de cada população existe uma grande variação genética, maior que a variação encontrada entre essas populações ($\Phi_{SC} = 0,12$), e também maior que a variação encontrada entre as sub-bacias ($\Phi_{CT} = 0,17$).

O terceiro critério de agrupamento consistiu em agrupar as populações amostradas em duas populações. A população 01 foi formada pelas sub-bacias localizadas nas regiões centro-oeste, noroeste, e sudoeste do estado de São Paulo (São José dos Dourados, Baixo-Tietê, Aguapeí, do Peixe, Turvo-Grande, Pontal do Paranapanema, Médio-Paranapanema, e Alto-Paranapanema), e a População 02 foi formada pelas sub-bacias localizadas na região nordeste do estado de São Paulo (Pardo-Grande e Sapucaí-Grande). O objetivo desse agrupamento foi testar se existe uma sub-estrutura populacional entre essas duas regiões do estado de São Paulo (centro-oeste/noroeste/sudoeste; e nordeste). Este teste mostrou que 45% da variação presente é atribuída a diferenças dentro das populações, 32% para as diferenças entre as populações e 18% devido às diferenças entre as populações dentro das populações ($\Phi_{ST} = 0,45$, $\Phi_{CT} = 0,32$, $\Phi_{SC} = 0,18$), respectivamente.

Os resultados de todos os testes estão mostrados na Tabela 04.

Tabela 04. Partição da variância genética determinada através da Análise da Variância Molecular para três critérios de agrupamentos. N corresponde ao número de grupos que compõe a estrutura hierárquica.

N	Agrupamento	Composição	Proporção da Variância		
			Entre grupos (Φ_{ct})	Entre populações (Φ_{sc})	Dentro de populações (Φ_{st})
1	Ausência de Estrutura	1 - SJ 1, SJ 2, SJ3, BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6, AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, PE 1, PE 2, PE 3, PP1, PP2, PP3, MP1, MP2, MP 3, MP 4, AP 1, AP 2, PC 1, PC 2, TG 1, TG 2, TG 3, TG 4, PG 1, PG 2, SG 1	0	0	0
10	Sub-bacias	1- SJ 1, SJ 2, SJ 3; 2- BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6; 3- AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6; 4- PE 1, PE 2, PE 3; 5- PP1, PP2, PP3; 6- MP1, MP2, MP 3, MP 4; 7- AP 1, AP 2; 8- PC 1, PC 2; 9- TG 1, TG 2, TG 3, TG 4; 10- PG 1, PG 2, SG 1	0,17	0,12	0,27
2	centro-oeste/noroeste/sudoeste; e nordeste	1- SJ 1, SJ 2, SJ 3; BT 1, BT 2, BT 3, BT 4, BT 5, BT 6; AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6; PE 1, PE 2, PE 3 TG 1, TG 2, TG 3, TG 4, PP1, PP2, PP3; MP1, MP2, MP 3, MP 4; AP 1, AP 2, 2- PG 1, PG 2, SG 1	0,32	0,18	0,45

3.5 Testes de neutralidade

Os testes de neutralidade de Tajima (1996), e Fu (1997), utilizados para testar se as variações encontradas estão sob o modelo de seleção neutra, apresentaram resultados significativos no nível de 5% de significância. No entanto, a hipótese de neutralidade das mutações foi rejeitada para todas as populações testadas, conforme pode ser observado na Tabela 05. Apesar disso, a significância dos indicadores D e F_s não pode ser descartada, pois serve de inferências para outros eventos que podem ter acometido essas populações, tais como afunilamento populacional ou heterogeneidade das taxas de mutação, e também o fato de que um valor negativo e alto para F_s é um bom indicador para eventos de expansão demográfica populacional.

Tabela 05. Resultados dos testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu para as populações.

População	N	Teste de Tajima D	Teste de Fu F_s
SJ	26	-1,828 $p=0,2$	-25,996 $p=0,0$
BT	33	-1,912 $p=0,1$	-26,036 $p=0,0$
AG	29	-0,314 $p=0,2$	-25,652 $p=0,0$
PE	15	-1,766 $p=0,0$	-29,413 $p=0,0$
PP	13	-2,026 $p=0,0$	-15,656 $p=0,0$
MP	12	-1,231 $p=-1,0$	-6,484 $p=$
AP	3	0,0 $p=-1,0$	-1,389 $p=0,5$
PC	11	-1,341 $p=0,4$	-4,982 $p=0,4$
TG	25	-0,576 $p=0,3$	-23,690 $p=0,0$
PGSG	8	-1,320 $p=0,1$	-3,656 $p=0,0$

4 Discussão

Neste trabalho foram analisados 805 bases nucleotídicas do gene mitocondrial citocromo B para 175 indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*, com o objetivo de inferir eventos históricos e recorrentes envolvidos na determinação da distribuição atual da variação genética de populações desta espécie. Os resultados da análise filogeográfica, gerada através da análise de agrupamentos de clados não enraizados mostraram, como evento principal envolvido, o fluxo gênico restrito pela distância com alguns eventos de expansão da área, sendo a distância geográfica o principal fator que está afetando o fluxo gênico em *A. altiparanae*. Ou seja, em uma geração, é esperado que um haplótipo particular se mova através de curtas distâncias geográficas, fazendo com que a distribuição deste haplótipo aumente com o passar do tempo e, conseqüentemente, das gerações. Por outro lado, enquanto a análise de agrupamento de clados não enraizados indicou significativamente o fluxo gênico restrito, a análise da variância molecular (AMOVA) detectou que a maior variação genética é encontrada dentro das populações. Estes resultados mostram que os níveis do fluxo gênico não são suficientemente altos para apagarem a informação histórica da origem geográfica.

A análise de agrupamento de clados não enraizados detectou uma inferência primária: fluxo gênico restrito através de isolamento por distância, observado em cinco clados estatisticamente significantes (clados 1-1-, 2-14, 3-2, 5-1, e 6-1). Esta análise detectou também dois eventos de fluxo gênico associados com a dispersão à longa distância (clados 3-4 e 3-7), e um evento de expansão da área de ocorrência para o clado 3-9. Para os clados 2-15 e 4-4, a análise de agrupamento de clados não enraizados considerou a amostra geográfica inadequada para se discriminar entre eventos de

fragmentação ou isolamento pela distância, e para o clado 4-1, o resultado da análise de agrupamento de clados não enraizados não foi conclusivo.

A análise de agrupamento de clados não enraizados detectou, conforme foi explicado anteriormente, o fluxo gênico restrito através de isolamento por distância como o principal processo envolvido na associação dos haplótipos com a distribuição geográfica. No entanto, os clados agrupados estatisticamente significantes não apresentam distribuições geográficas exclusivas, existindo, em maior ou menor grau, sobreposição espacial.

O clado 1-1 é um agrupamento particularmente interessante, pois inclui o haplótipo 01. De acordo com a teoria da coalescência, podemos considerar o haplótipo 01 como o mais antigo (haplótipo ancestral) (Castelloe & Templeton, 1994; Templeton, 1998), por ser o haplótipo mais comum, ocorrendo em 54 indivíduos dos 175 indivíduos analisados, amplamente distribuído geograficamente e presente em 24 das 36 populações amostradas. O haplótipo 01 é também o centro de uma filogenia em forma de estrela (ver Figura 09), um padrão caracterizado pela presença de ramos curtos, que conectam, separadamente, por um passo mutacional, um determinado haplótipo aos demais haplótipos do clado (Avice, 2000). Este padrão também sugere que a população sofreu uma expansão demográfica relativamente recente (Rogers & Harpending, 1992), que foi detectada através da análise da “*mismatch distribution*” (ver Figura 11).

O haplótipo 01 está ligado por poucos passos mutacionais a outros haplótipos geograficamente restritos, e ligado por vários passos mutacionais aos demais haplótipos. Baseado nessas observações podemos inferir um possível processo que pode ter acometido as populações de *A. altiparanae* analisadas neste estudo. A população ancestral, que carregava o haplótipo 01, sofreu uma expansão da sua área de

ocorrência, ficando este haplótipo geograficamente espalhado. Ao sofrer uma mutação, este haplótipo origina um haplótipo derivado, que permanece restrito na área de ocorrência do haplótipo ancestral e isolado das demais populações devido à distância geográfica. Com o passar do tempo, esses haplótipos derivados vão se tornando espalhados geograficamente, e originam novos haplótipos que, primeiramente, ficam restritos às suas áreas de origem, e podem se espalhar com o passar do tempo e das gerações, caracterizando uma variação haplotípica transitória.

Esta variação haplotípica é considerada transitória, pois, caso haja tempo suficiente, existe uma tendência natural do fluxo gênico resultar em homogeneidade genética. Por outro lado, como existe o fator limitante da distância geográfica, esta homogeneidade dificilmente será atingida, pois, com o passar do tempo, novas mutações podem ocorrer, resultando em novos haplótipos, que, com o passar do tempo começam a se espalhar geograficamente. Sob a ação do fluxo gênico, existe a tendência à homogeneidade genética (Avise, 2000), que, no entanto, é limitada pela distância geográfica, e assim, sucessivamente, tornando a variação haplotípica transitória e dinâmica. Em outras palavras, a variação haplotípica, numa escala temporal de milhares de anos, está sendo constantemente alterada.

O clado 2-14 está posicionado em uma das extremidades do agrupamento total (ver Figura 09). Esta posição indica que os haplótipos incluídos nesse agrupamento são relativamente recentes, e provavelmente foram originados do haplótipo 07. A distribuição espacial dos haplótipos presentes neste clado (ver Figura 12), combinada com suas posições dentro do clado 2-14, sugerem que a direção da migração, que é o evento que pode levar ao fluxo gênico é, da população AG 4, localizada geograficamente em uma posição relativamente mais à jusante, em relação ao Reservatório de Itaipu, dentro da bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo, para a população TG 2,

localizada geograficamente em uma posição relativamente mais à montante dentro desta bacia.

Assim como no clado 2-14, no clado 2-15, a distribuição geográfica do haplótipo 03 (ver Figura 14), considerado o mais antigo dentro deste clado por ser o mais interior, e a distribuição geográfica dos demais haplótipos, também sugerem uma tendência da direção da migração, ser de regiões mais à jusante para regiões mais à montante, dentro da bacia do alto Rio Paraná no estado de São Paulo. No entanto, para o clado 2-15, a análise de agrupamento de clados não enraizados não conseguiu discriminar entre eventos de fragmentação ou isolamento pela distância para explicar a associação dos haplótipos com a distribuição geográfica. Talvez devido à presença de haplótipos proximamente conectados, mas geograficamente separados por uma grande distância, como o haplótipo 15, localizado nas populações TG 1 e TG 2, conectado por dois passos mutacionais ao haplótipo 83, localizado na população AP 2, distantes entre si por mais de 800 quilômetros.

Os clados 2-14 e 2-15, junto com os clados 2-8, 2-9, 2-16, e 2-17 formam o clado 3-2, caracterizando este clado as várias linhagens surgidas a partir de determinados haplótipos mais antigos, como os haplótipos 03 e 15 (ver Figura 09). Este clado apresenta uma ampla distribuição geográfica, e algumas populações abrigam vários haplótipos distintos, entre estes, haplótipos ancestrais co-existindo com seus descendentes (populações AG 1, AG 5, TG 1, TG 2). Neste clado, aparentemente, a direção da migração, é de regiões relativamente mais à jusante para regiões relativamente mais à montante dentro da bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo, já que a maioria dos haplótipos mais recentes (localizados nas extremidades do clado) é encontrada nas sub-bacias TG 1 e TG 2, localizadas em uma região relativamente mais à montante (ver Figura 16).

Para os clados 3-4 e 3-7, o fluxo gênico está associado com eventos de dispersão à longa distância. No clado 3-4, a dispersão à longa distância provavelmente está relacionada com a localização do haplótipo 54, e também do haplótipo 18, que estão geograficamente distantes entre si, e também dos demais haplótipos deste clado, que se encontram localizados em populações geograficamente próximas (ver Figura 18). No clado 3-7 está presente o haplótipo 09, que, assim como o haplótipo 01 no clado 1-1, também é o centro de uma filogenia em forma de estrela, porém com um número menor de haplótipos conectados (ver Figura 09). O haplótipo 09 está localizado em três populações relativamente equidistantes, sendo uma na porção relativamente à jusante (PP 3), uma na porção relativamente intermediária (AG 5) e a terceira na porção relativamente mais à montante (TG 1) da bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo, e os haplótipos derivados encontram-se localizados geograficamente próximos (ver Figura 20). A presença do haplótipo 9 nas três populações acima citadas, caracteriza a dispersão à longa distância, enquanto os haplótipos derivados do haplótipo 9 que apresentam distribuições restritas, caracterizam o fluxo gênico restrito pela distância detectado. A direção da migração, aparentemente, também é das regiões relativamente mais à jusantes para regiões relativamente mais à montantes da bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo.

O clado 3-9 foi o único agrupamento em que foi detectado, através da análise de agrupamento de clados não enraizados, um evento de expansão da área de ocorrência. Neste clado, encontra-se o haplótipo 1, considerado o haplótipo ancestral, que provavelmente sofreu uma expansão passada da área de ocorrência, ficando amplamente distribuído geograficamente (ver Figura 22), e posteriormente, originou os demais haplótipos agrupados no clado 3-9.

O clado 4-4 (formado pelos cladogramas 3-1 e 3-6) (ver Figura 09), representa uma exceção em relação aos demais cladogramas estatisticamente significativos por, neste agrupamento, existir uma separação geográfica entre os cladogramas 3-1 e 3-6. Apesar da análise de agrupamento de cladogramas não enraizados não ter distinguido entre eventos de fragmentação ou isolamento pela distância como sendo o processo que resultou na distribuição geográfica dos haplótipos que compõem este clado, a distribuição espacial dos haplótipos agrupados neste clado mostra uma separação geográfica entre os cladogramas 3-1 e 3-6. O clado 3-1 agrupa os haplótipos que foram encontrados nas sub-bacias do Pardo-Grande e Sapucaí-Grande, localizadas geograficamente na região nordeste do estado de São Paulo, na porção mais à montante da bacia do alto Rio Paraná analisada neste trabalho. O clado 3-6 agrupa os haplótipos localizados em sub-bacias no centro-oeste e noroeste do estado de São Paulo (ver Figura 28). Conforme pode ser observado pela Figura 09, dentro do clado 4-4, o clado 3-6 (interior) é mais antigo, enquanto o clado 3-1 (extremidade) é mais recente, e provavelmente originado a partir de um haplótipo agrupado no clado 3-6. No clado 4-4, a estrutura populacional encontrada não é entre sub-bacias, mas entre regiões que incluem diferentes sub-bacias, no caso, entre a região nordeste e as regiões noroeste e centro-oeste do estado de São Paulo, indicando que pode existir, ou ter existido no passado, uma barreira geográfica que separou as populações de *A. altiparanae* destas duas regiões e, de acordo com a posição destes dois cladogramas no agrupamento total (clado 3-6, interior; e clado 3-1, extremidade), a direção da migração é, ou foi, também das regiões relativamente mais à jusantes para regiões relativamente mais à montantes da bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo.

O clado 5-1 agrupa haplótipos presentes em praticamente todas as populações amostradas, com exceção daquelas localizadas na região nordeste do estado de São Paulo (populações PG 1, PG 2, e SG 1), a não ser pela presença do haplótipo 1 na população

PG 1 (ver Figura 30). A presença do haplótipo 1 na população PG 1 sugere que a expansão da área de ocorrência deste haplótipo, detectada no clado 3-9, provavelmente foi um evento relativamente antigo, anterior a ocupação desta região pelo haplótipo 6, considerado, dentro do universo dos haplótipos amostrados, o haplótipo ancestral nas populações PG 1, PG 2, e SG 3 (ver Figuras 09 e 28).

O clado 6-1 envolve a totalidade das amostras analisadas neste trabalho, separada entre os cladogramas 5-1 e 5-2, porém, como pode ser observado pela Figura 32, não existe uma separação geográfica entre estes dois cladogramas, existindo haplótipos separados por vários passos mutacionais que co-existem em uma mesma população. Ou seja, linhagens distantes geneticamente vivendo em simpatria, o que faz com que este agrupamento total assemelhe-se a Categoria II dos padrões filogeográficos descritos por Avise (2000), caracterizado por pronunciados “gaps” filogenéticos entre alguns ramos na árvore gênica, com as principais linhagens em simpatria por toda a área, indicando alto tamanho populacional efetivo e alto fluxo gênico. Este agrupamento, também mostra que os eventos evolutivos se sobrepõem temporalmente.

Os testes de neutralidade D de Tajima (1996), e F_s de Fu (1997) foram aplicados às populações agrupadas em sub-bacias, pois, em alguns casos, o tamanho amostral de algumas populações foi significativamente reduzido. Apesar das populações terem sido agrupadas em sub-bacias, o tamanho populacional variou entre 03 a 29 indivíduos por população, valores considerados baixos para se obter um poder razoável na detecção de algumas forças evolutivas (Simonsen et al., 1995). No entanto, se por um lado, um tamanho amostral pequeno impede um argumento razoável para a neutralidade, caso os resultados dos testes não forem significantes, por outro lado, se a neutralidade for significativamente rejeitada, o tamanho amostral reduzido proporciona uma convincente evidência de fortes forças evolutivas atuando (de Brito et al., 2002). Os altos valores

negativos obtidos com os testes D e F_s , para todas as populações, sugerem que a força evolutiva que causou a rejeição da neutralidade foi a expansão demográfica populacional.

Os resultados da análise da variância molecular (AMOVA) realizada para quantificar a variação genética entre as 10 sub-bacias (grupos), entre as populações, e dentro das populações (Φ_{ct} , Φ_{sc} , e Φ_{st} , respectivamente), foram moderados e altos ($\Phi_{ct} = 0,17$, $\Phi_{sc} = 0,12$, e $\Phi_{st} = 0,27$), indicando que a maior proporção da variabilidade genética está presente dentro das populações ($\Phi_{st} = 0,27$). Entre as sub-bacias (grupos), a variabilidade é considerada grande ($\Phi_{ct} = 0,17$), e entre as populações, a variabilidade genética é considerada moderada ($\Phi_{sc} = 0,12$). A estruturação dentro das populações é provavelmente, devida a alta variação haplotípica muitas vezes encontrada em uma mesma população, e a estruturação em sub-bacias pode ser devida à distribuição dos haplótipos individuais que estão restritos a determinadas populações.

Devido a esta separação geográfica, encontrada através da análise de agrupamento de clados não enraizados, para o clado 4-4, foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), agrupando as sub-bacias amostradas em dois grupos, um grupo contendo as sub-bacias localizadas na região nordeste (sub-bacias do Pardo-Grande e Sapucaí-Grande) todas afluentes da margem esquerda do Rio Grande, e outro grupo contendo as demais sub-bacias, todas afluentes da margem esquerda do Rio Paraná (com exceção da sub-bacia Piracicaba-Capivari-Jundiá, que não foi incluída nesta análise). Os resultados da análise de variância molecular, contrastando esses dois grupos, mostraram que dentro das sub-bacias existe cerca de 45% da variação genética detectada ($\Phi_{st} = 0,45$), entre os grupos existe 32% da variação genética detectada ($\Phi_{ct} = 0,32$), e entre as sub-bacias, a variação genética detectada foi de 18% (Φ_{sc}). Através deste resultado, pode ser sugerido um evento vicariante definindo uma estrutura populacional na espécie isolando os dois grupos, mas não impedindo o fluxo gênico dentro destes.

Considerando estes dois critérios de agrupamento testados através da análise da variância molecular (AMOVA), os valores encontrados sugerem que a alta variabilidade genética encontrada dentro das populações reflete a alta diversidade de haplótipos, que estão distribuídos geograficamente de acordo com o modelo de fluxo gênico restrito através de isolamento por distância. O resultado de Φ_{ct} , obtido ao contrastar as sub-bacias localizadas nas regiões noroeste/centro-oeste e sudoeste do estado de São Paulo, com as sub-bacias localizadas na região nordeste do estado de São Paulo, mostrou que existe diferenciação genética entre estas duas regiões ($\Phi_{ct} = 0,32$).

O fluxo gênico restrito pela distância, detectado através da análise de agrupamento de clados não enraizados, como o principal evento responsável pela associação dos haplótipos com a distribuição geográfica, deve envolver, provavelmente, não só os indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae* de populações de riachos e cabeceiras, mas também aqueles provenientes de populações dos maiores rios da bacia do Alto Rio Paraná, já que esta espécie ocorre, tanto em riachos e cabeceiras, como na calha dos grandes rios (Garutti & Britski, 2000; Garutti, 1988 a, 1993; Garutti & Figueiredo-Garutti, 1992). *A. altiparanae* é considerada uma espécie que, dentre as espécies de peixes de água doce que apresentam pequeno porte, possui capacidade natatória relativamente alta, sendo capaz de realizar migrações, e é amplamente distribuída na bacia do Alto Rio Paraná, tanto em número de indivíduos, como também em biomassa (Castro et al., 2003; 2004; 2005). Além disso, esta espécie parece ser sensível ao volume de água disponível, pois, através de observações feitas durante a realização das coletas para o presente trabalho, foi constatado que em épocas de seca, quando diminui o volume de água dos leitos dos riachos, as populações destes ambientes parecem diminuir em número de indivíduos. Observações a respeito da diminuição do número de indivíduos de outras espécies de lambaris, em ambientes de

riachos, durante a estação seca, também foram feitas por outros autores. Casatti (1996), estudou a biologia de peixes da cabeceira do Rio São Francisco, localizada no estado de Minas Gerais, e constatou uma diminuição no número de indivíduos pertencentes à antiga subfamília Tetragonopterinae durante o inverno, que corresponde à estação seca no sudeste brasileiro. Pelição (1997), estudando a espécie *Deuterodon pedri*, que até recentemente pertencia a subfamília Tetragonopterinae (Reis, 2003), e atualmente é considerada *incertae sedis* dentro de Characidae (Lima et al., 2003), em um riacho e estuarino localizado em Ubatuba-SP, também relatou uma diminuição do número de indivíduos na porção inferior do riacho durante a estação seca (inverno). Provavelmente, esta diminuição no número de indivíduos de espécies que apresentam biologia similar, inclusive em relação à capacidade natatória, nas populações de riachos durante épocas de seca, pode estar relacionada com migrações destes indivíduos para outras regiões, onde, mesmo durante a estação seca, exista um maior volume de água.

Levando em conta esta possibilidade, de os indivíduos da espécie *A. altiparanae*, habitantes de populações localizadas nos riachos e cabeceiras, migrarem para rios maiores na bacia do Alto Rio Paraná durante épocas em que o volume de água desses riachos diminui, podemos então considerar que, os maiores rios das sub-bacias, e da bacia do Alto Rio Paraná, não correspondam à barreiras geográficas ao fluxo gênico para a espécie *A. altiparanae*.

Além da ausência de barreiras geográficas, provavelmente também não existem barreiras ecológicas entre as populações de *A. altiparanae*. Isto porque, conforme foi relatado na introdução deste trabalho, esta espécie possui determinadas características biológicas, como ser nectônica, nadadora rápida, e pouco dependente de esconderijos nos micro-habitats bentônicos para evitar a predação (Casatti, 2002); ser onívora, o que deve torná-la capaz de adaptar-se às ofertas alimentares diferenciais tanto

do ponto de vista geográfico quanto sazonal (Castro et al., 2004), apresentar desovas parceladas durante todo o ano em pequenos corpos d'água como riachos, e desova total em grandes corpos d'água (Garutti, 1989), não apresentar cuidado parental (Agostinho & Júlio Jr., 1999), e os ovos serem flutuantes (Godoy, 1975) fazendo com que a espécie seja, portanto, relativamente independente do substrato para reprodução. Estas características biológicas, provavelmente, também permitem que *A. altiparanae*, dentro do ambiente dulci-aquícola, seja capaz de sobreviver e se reproduzir nas mais variadas condições ambientais.

Esta provável ausência de barreiras, tanto geográficas, quanto ecológicas, ao fluxo gênico entre as populações, reforça o principal resultado obtido pela análise de agrupamento de clados não enraizados, de que existe fluxo gênico, porém este é limitado pela distância. Este modelo permite a troca gênica entre indivíduos de populações próximas geograficamente, mas limita a troca entre os indivíduos de populações mais afastadas.

Os resultados obtidos através da análise de agrupamento de clados não enraizados, e através da análise da variância molecular (AMOVA), utilizando o gene mitocondrial citocromo B como marcador molecular, mostraram que, para *A. altiparanae*, os grupos genéticos definidos estão associados à regiões geográficas (ver Figuras 10, 12, 14,16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30), que envolvem populações de diferentes sub-bacias, não tendo sido detectado isolamento entre as sub-bacias (ver Tabela 06). Estes resultados, combinados com a provável ausência de barreiras geográficas e ecológicas ao fluxo gênico entre as populações, sugerem que a dinâmica populacional de *A. altiparanae* seja marcada por eventos migratórios com fluxo gênico, o que estabelece para esta espécie, uma dinâmica populacional distinta da proposta por Castro (1999) que

sugere um grau maior de isolamento ecológico, adaptativo e geográfico, para as espécies de peixes de riachos..

No entanto, esta dinâmica populacional de *A. altiparanae* envolvendo migração e fluxo gênico é limitada pela distância, o que a diferencia da dinâmica populacional de espécies que apresentam porte médio a grande, como por exemplo, a dinâmica populacional dos prochilodontídeos. Recentemente, os prochilodontídeos (Família Prochilodontidae, Ordem Characiformes), peixes de médio porte, amplamente distribuídos geograficamente, habitantes das calhas dos grandes rios da América do Sul, têm sido alvo de estudos biogeográficos, filogenéticos e filogeográficos, (Castro & Vari, 2004; Sivasundar et al., 2001; Turner et al., 2004;). Guardadas as devidas proporções em relação ao porte desses Characiformes, *A. altiparanae* e espécies de prochilodontídeos podem ser comparadas no que diz respeito a possuírem ampla distribuição em suas respectivas áreas de ocorrência, são peixes migratórios com grande capacidade natatória, respeitando seus respectivos portes médios. Os estudos filogeográficos com os prochilodontídeos demonstraram que não há, entre as populações estudadas, estrutura genética populacional. Os resultados obtidos no presente trabalho para a espécie *A. altiparanae*, demonstraram que, entre as populações analisadas, ocorre um tipo de estruturação genética moderada, o fluxo gênico restrito pela distância.

A comparação desses diferentes resultados pode indicar que o tamanho seja um fator limitante à capacidade de dispersão de *A. altiparanae*. Entre os peixes de pequeno porte habitantes de riachos e cabeceiras, *A. altiparanae* é, aparentemente, a espécie que possui a melhor combinação de características adequadas à dispersão e exploração de diferentes ambientes, como os pequenos riachos, cabeceiras, e canais principais dos grandes rios. Apesar desses atributos, os resultados do presente trabalho demonstraram que existe uma estruturação genética causada por fluxo gênico restrito

pela distância entre as populações analisadas. Porém, esse tipo de estruturação, não é capaz de promover o isolamento completo entre as populações, e os níveis de fluxo gênico entre as mesmas não são suficientemente altos para apagarem a informação histórica da origem geográfica.

Apesar das características da espécie *A. altiparanae* pouco favoráveis à estruturação populacional, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que ela existe moderadamente, sendo caracterizada pelo fluxo gênico restrito pela distância. A partir deste resultado, é possível supor que outras espécies de peixes de riachos, que possuem capacidade de deslocamento realmente restrita, em comparação com *A. altiparanae* estejam organizadas em populações com maior nível de estruturação genética, assim como a possibilidade de espécies com dinâmica populacional similar a de *A. altiparanae* apresentarem um padrão também similar de estruturação genética causada por fluxo gênico restrito pela distância.

5 Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram que as populações de *Astyanax altiparanae* localizadas na bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo, estão estruturadas geneticamente sob o modelo do fluxo gênico restrito pela distância, não estando estruturadas em sub-bacias, e que provavelmente não existam barreiras geográficas, tampouco ecológicas, ao fluxo gênico entre as populações, incluindo àquelas localizadas nos rios principais desta bacia. A distância geográfica entre as populações parece ser o único fator limitante ao fluxo gênico.

Apesar da ocorrência de fluxo gênico entre as populações analisadas, este é restrito pela distância geográfica, provavelmente devido ao pequeno porte dos indivíduos da espécie *A. altiparanae*. Este resultado sugere que o tamanho reduzido das espécies de peixes de riachos provavelmente seja o principal fator limitante à dispersão destas espécies, o que está de acordo com a hipótese de Castro (1999), de que a capacidade de deslocamento relativamente baixa e limitada das espécies de pequeno porte, que restringe as suas distribuições geográficas, poderia facilitar a separação geográfica de populações, e desta forma favorecer o surgimento de novas espécies devido ao isolamento geográfico.

Diferentemente do caso dos prochilodontídeos de porte médio, excelentes nadadores (Castro & Vari, 2004), que apresentam populações não estruturadas em todas as bacias hidrográficas que foram estudadas sem, portanto qualquer restrição aparente ao fluxo gênico entre os indivíduos (Sivasundar et al., 2001; Turner et al., 2004), a espécie *A. altiparanae* apresenta uma estrutura populacional na bacia do Alto Rio Paraná no estado de São Paulo, com fluxo gênico restrito pela distância, porém sem a ocorrência de populações isoladas, que seriam candidatas à possível diferenciação genética futura, caso houvesse tempo suficiente para tal.

Esses resultados indicam que as limitações ao deslocamento de longa distância impostas pelo pequeno porte dos indivíduos adultos de *A. altiparanae*, quando comparados aos prochilodontídeos sejam as principais responsáveis pela estrutura populacional encontrada. Porém, características biológicas peculiares de *A. altiparanae*, todas elas relacionadas à uma extrema flexibilidade ecológico-adaptativa, aparentemente impedem o isolamento ecológico e geográfico dessas populações, como seria de se esperar dentro do cenário evolutivo ideal proposto por Castro (1999), para a diversificação da ictiofauna de riachos sul-americanos.

No entanto, todas as demais espécies de peixes de pequeno porte que habitam riachos e cabeceiras, que não apresentam as mesmas características que conferem à espécie *A. altiparanae* condições para sua ampla distribuição geográfica na bacia do Alto Rio Paraná, e conseqüentemente possuem mais restrições à dispersão e menor capacidade de deslocamento, são fortes candidatas a apresentarem estrutura populacional mais pronunciada, e possivelmente, até mesmo a presença de barreiras físicas e/ou ecológicas impedindo o fluxo gênico entre suas populações componentes.

Somente novos estudos filogeográficos, com outras espécies de peixes de pequeno porte habitantes de riachos, e a utilização de diferentes marcadores, poderão responder a esta interessante questão biogeográfica e evolutiva, que relaciona a dinâmica populacional das espécies de pequeno porte habitantes de riachos e cabeceiras, com a separação geográfica de populações, favorecendo o surgimento de novas espécies devido ao isolamento geográfico (Castro, 1999).

6 Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia*, 52: 1-21.
- Agostinho, A.A. Júlio Jr., H.F. 1999. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A. A.; Cunningham, P.T. (eds.). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP, São Paulo, p. 374-400.
- Almeida, F.S. Fungaro, M.H.P. Sodré, L.MK. 2001. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *J. Zool., London* 253: 113-120.
- Apostolidis, A.P. Triantaphyllidis, C.A. Kouvatsi, P. Economidis, S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L (Greek brown trout) populations. *Molec. Ecol.* 6 (6): 531-542.
- Aranha, J.M.R. Takeuti, D.F. Yoshimura, T.M. 1998. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. *Rev. Biol. Trop.* 46:951-959.
- Arias, Maria Cristina; Infante-Malachias, Maria Elena. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos de DNA. In Matioli, S. R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Hólus, 2001. p.143-152.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molec. Ecol.* 7, p.371-379.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts London, England.
- Avise, J.C. Arnold, J. Ball, R.M. Bermingham, E. Lamb, T. Neigel, J.E. Reeb, C.A. Saunders, N.C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annu. Ver. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Bermingham, E. Avise, J.C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 3: 189-195.
- Bermingham, E. Martin, A.P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molec. Ecol.* 7: (4) 499-517.
- Bermingham, E. Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molec. Ecol.* 7: 367-369.
- Bernatchez, L. Wilson, C.G. 1998. Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes. *Molec. Ecol.* 7: (4) 431-425.

- Briggs, J.C. 1979. Ostariophysian zoogeography: an alternative hypothesis. *Copeia* (1): 111-118.
- Britski, H.A. Langeani, F. 1988. *Pimelodus paranaensis*, sp. n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. *Revta Bras. Zool.*, 5: 409-417.
- Castro, R. M. C. & N. A. Menezes, 1998. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. Pp. 1-13, *In*: R. M. C. Castro (ed.), C. A. Joly & C. E. M. (orgs.), Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, Vol. 6, Vertebrados. WinnerGraph - FAPESP, São Paulo, 71 pp.
- Casatti, L. 1996. Biologia e ecomorfologia dos peixes de um trecho de corredeiras no curso superior do Rio São Francisco, São Roque de Minas, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista-Campus de Botucatu, Instituto de Biociências, 90 p.
- Casatti, L. 2002. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 2(2): 1-14.
- Casatti, L. Castro, R.M.C. 1998. A fish community of the São Francisco River headwaters riffles, south-eastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 9:229-242.
- Castelloe, J. Templeton, A.R. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol. Phylo. Evol.* 3: 102-113.
- Castro, R.M.C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *In* *Ecologia de Peixes de Riachos - Série Oecologia Brasiliensis* (E. P. Caramashi, R. Mazzoni & P. R. Peres-Neto, eds.), VI, pp 139-155.
- Castro, R.M.C. Casatti, L. 1997. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River Basin, southeastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 7: 337-352.
- Castro, R.M.C. Menezes, N.A. 1998. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, vol. 6 Vertebrados (R.M.C. Castro, ed., C. A. Joly & C.E.M. Bicudo, orgs.) WinnerGraph – FAPESP, São Paulo, p. 1-13.
- Castro, R.M.C. Vari, R.P. 2004. Dentritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. *Smithsonian Contributions to Zoology*; 622. Washington D.C
- Castro, R.M.C., L. Casatti, H.F. Santos, K.M. Ferreira, A.C. Ribeiro, R C. Benine, G.Z.P. Dardis, A.L.A. Melo, R. Stopiglia, T.X. Abreu, F.A. Bockmann, M. Carvalho, F.Z. Gibran; F.C.T. Lima. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotrop.* 3: 1-31.

- Castro, R.M.C., L. Casatti, H.F. Santos, A.L.A. Melo, L.S.F. Martins, K.M. Ferreira, F.Z. Gibran, R.C. Benine, M. Carvalho, A.C. Ribeiro, T.X. Abreu, F.A. Bockmann, G.Z. Pelicão, R. Stopiglia; F. Langeani. 2004. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* 4: 1-39.
- Castro, R.M.C., L. Casatti, H.F. Santos, R.P. Vari, A.L.A. Melo, L.S.F. Martins. T.X. Abreu, R.C. Benine, F.Z. Gibran, A.C. Ribeiro, F.A. Bockmann, M. Carvalho G.Z. Pelicão, K.M. Ferreira R. Stopiglia, A. Akama. 2005. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 16 (3):193-214.
- Clement, M. Posada. D. Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.
- Costa, W.J.E.M. 1984. Peixes fluviais do sistema lagunar de Marica, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Atlântica* 7:65-92.
- Crandall, K.A. Templeton, A.R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- Crandall, K.A. Templeton, A.R. Sing, C.F. 1994. Intraspecific phylogenetics: Problems and solutions. In *Phylogeny Reconstruction*, R. W. Scotland, D.J. Siebert, and D. M. Williams (eds.). Oxford: Clarendon Press, pp. 273-297.
- Darlington, P.J.Jr. 1957. *Zoogeography: the geographical distribution of animal*. John Wiley & Sons, New York, 675 p.
- de Brito, R.A. Manfrin, M.H. Sene, F.M. 2002. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetics and Molecular Biology* 25 (2): 161-171.
- Eldredge, N. Cracraft, J. 1980. *Phylogenetics patterns and the Evolutionary Process*. Columbia University Press, N.Y., 349 pp.
- Excoffier, L. Smouse, P.E. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 346-359.
- Excoffier, L. Smouse, P.E. Quattro, J.M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ewens, W.J. 1979. *Mathematical population genetics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Eyre-Walker, A. Awadalla, P. 2001. Does human mtDNA recombine? *J. Mol. Evol.* 53:430-5

- Fernandes-Matioli, Flora Maria de Campos. Genealogias e o processo de coalescência. In: Matioli, S. R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Hólos, 2001. p.162-170.
- Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. 1ª ed., Clarenton, Oxford.
- Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 763p.
- Galindo, B.A. Martinez, C.B.R. Almeida, F.S. Sodré, L.M.K. Sofia, S.H. 2005. Estrutura genética de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) em dois ribeirões urbanos, Londrina, PR. Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética. www.sbg.org.br, ISBN 85-89109-05-4, p. 98.
- Garutti, V. 1988a. Distribuição longitudinal da ictiofauna de um córrego na região noroeste do Estado de São Paulo. *Bacia do Rio Paraná. Rev. Bras. Biol.* 48:747-759.
- Garutti, V. 1988b. Morfologia, reprodução e aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do Rio Paraná. Tese de Doutorado, programa de Pós-Graduação do IBUSP, área de concentração Zoologia, São Paulo, 151 pp.
- Garutti, V. 1989. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do Rio Paraná. *Rev. Brasil. Biol.*, 53(2): 159-166.
- Garutti, V. 1993. Raios da nadadeira anal de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae), procedente da região noroeste do Estado de São Paulo, bacia do Rio Paraná. *Rev. Brasil. Biol.*, 49 (2): 489-495.
- Garutti, V. Figueiredo-Garutti, M.L. 1992. Caracterização de populações do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae), procedentes do campus de Jaboticabal, UNESP, SP. *Naturalia*, 17: 17-29.
- Garutti, V. Britski, H.A. 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool.* Porto Alegre, 13: 65-88.
- Géry, J. 1969. The fresh-water fishes of South America. Pp. 828-848 in: E.J. Fittkau et al. (eds.), *Biogeography and ecology in South America*, vol. 2. Junk, The Hague.
- Godoy, M.P. 1975. Peixes do Brasil: subordem Characoidei; bacia do Rio Mogi Guassu. Ed. Franciscana, Piracicaba, v.1, p. 1-216.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Hum. Biol. 66: 591-600.
- Hartl, D.L. Clark, A.G. 1989. Principles of population genetics. 2^a ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hendry, A.P. Kinnison, M.T. 2001. An introduction to microevolution: rate, pattern, process. Genetica 112-113: 1-8.
- Hillis, D.M. Larson, A. Davis, S. K Zimmer, E.A. 1990. Nucleic Acids III: Sequencing In "Molecular Systematics" (D. M. Hillis & C. Moritz, eds.), pp 327-328. Sinauer associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hudson, R.R. 1982. Estimating genetic variability with restriction endonucleases. Genetics 100: 711-719.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process, pp. 1-44. In Oxf. Surv. Evol. Biol., edited by Futuyama and J.D. Antonovics. Oxford University Press, New York.
- Jacobo, M.A.C. Veron, M.C.B. 1995. Relaciones troficas de la ictiofauna de cuencas autoctonas del Chaco Oriental, Argentina. Rev. Brasil Biol. 55: 419-437.
- Kingman, J.F.C. 1982. The coalescent. Stochat. Proc. Appl. 13: 235-248.
- Knowles L.L. Maddison, W.P. 2002. Statistical Phylogeography. Molecular Ecology 11: 2623-2635.
- Langeani, F. 1990. Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888, com a descrição de quatro novas espécies do Sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). Comun. Mus. Ciênc. PUCRS, Sér. Zool., 3:3-31.
- Lima, F.C.T., L.R. Malabarba, P.A. Buckup, J.F. Pezzi da Silva, R.P. Vari, A. Harold, R. Benine, O.T. Oyakawa, C.S. Pavanelli, N.A. Menezes, C.A.S. Lucena, M.C.S.L. Malabarba, Z.M.S. Lucena, R.E. Reis, F. Langeani, L. Cassati and V.A. Bertaco, 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae.. p. 106-168. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Lovejoy, N.R. de Araújo, M.L.G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. Molecular Ecology 9:259-268.
- Lowe-McConnell, R.H. 1987. Ecological Studies in Tropical Fish Communities. Cambridge University Press, Cambridge, 382 pp.
- Lowe-McConnell, R.H. 1989. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 534 p.

- Lundberg, J.G. 1993. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. Pp. 156-199, *In: Biological relationships between Africa and South America*. P. Goldblatt (Ed.), Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Lydeard, C. Roe, K.J. 1997. The Phylogenetic Utility of the Mitochondrial Cytochrome b Gene for Inferring Relationships among Actinopterygian Fishes. In *Molecular Systematics of Fishes* (T. D. Kocher & C. A. Stepien eds.) Academic Press, San Diego, California.
- Maddison, D.R. Ruvolo, M. Swofford, D.L. 1992. Geographic origins of human mitochondrial DNA: Phylogenetic evidence from control region sequences. *Syst. Biol.* 41: 111-124.
- Marjoram, P. Donnelly, P. 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics* 136: 673-683.
- Mann, R.H.K. Mills, C.A. Crisp, D.T. 1990. Geographical variation in the Life-history Tactics of some species of freshwater fish. In Potts, G.W. e Wootton, R.J. (eds). *Fish reproduction: Strategies and Tactics*. London, Academic Press, 371p.
- Matoso, D.A. Artoni, R.F. Galleti Jr., P.M. 2004. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527: 223-225.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mazzoni, R. Lobón-Cerviá, J. 2000. Longitudinal structure, density, and production rates of a Neotropical stream fish assemblage: the river Ubatiba in the Serra do Mar (South-East Brazil). *Ecography* 23:588-602.
- Menezes, N.A. 1988. Implication of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. Pp. 295-304 In P.E. Vanzolini & W.R. Heyer (eds.), *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 488 pp.
- Menezes, N.A. 1996a. Conservação da diversidade da ictiofauna da Bacia Paraná-Paraguai-Uruguaí. *Anais XV Congresso Pan-americano de Ciências Veterinárias*, Campo Grande, MS, 4 pp.
- Menezes, N.A. 1996b. Methods for assessing freshwater fish diversity. In *Diversity in Brazil* (C.E.M. Bicudo & N.A. Menezes, eds.). CNPq, São Paulo, p.289-312.
- Mullis, K.B. Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

- Moritz, C. Dowling, T.E Brown, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. ver. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Myers, G.S. 1938. Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Smithsonian Rep.*, 1937: 339-364.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Pavanelli, C.S. Caramaschi, E.P. 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Rico, Paraná state, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 8:23-31.
- Pelição, G.Z. 1996. Estratégia de osmorregulação de *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1908 (Characidae, Characiformes), um lambari da divisão primária, no estuário de um rio costeiro em Ubatuba, SP. Monografia de Bacharelado, Depto. de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo. 27 p.
- Penczac, T. Agostinho, A.A. Okada, E.K. 1994. Fish diversity and community structure in two small tributaries of the Paraná river, Paraná state, Brazil. *Hydrobiol.* 294: 243-251.
- Perdices, A. Cunha, C. Coelho, M.M. 2003. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Ciprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 192-203.
- Posada, D. Crandall, K. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution.* 16 (1): 37-4.
- Posada, D. Crandall, K. Templeton, A.R. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molec. Ecol.* 9: 487-488.
- Peres Neto, P.R. Bizerril, C.R.S.F. Iglesias, R. 1994. An overview of some aspects of river ecology: a case study on fish assemblages distribution in a eastern Brazilian coastal river. Pp. 265-279. In Esteves, F.A. (ed.), *Oecologia Brasiliensis, Vol I: Estrutura, funcionamento e Manejo de Ecossistemas Brasileiros*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M.; Prioli, L.M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, base don mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, 4, 421-430.
- Reis, R.E. 2003 In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.

- Rogers, A.R. Harpending, H. 1992. Population Growth makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology Evolution*. 9 (3): 552-569.
- Rozas, J. Sánchez DelBarrio, J.C., Messeguer, X.; Rozas, R., 2003. DnaSp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sabino, J. Castro, R.M.C. 1990. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (sudeste do Brasil). *Revista Brasileira de Biologia*, 50 (1): 23-36.
- Sabino, J. Zuanon, J.A. 1998. A stream fish assemblage in Central Amazônia: distribution, activity patterns and feeding behavior. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 8: 201-210.
- Scheffler, I.E. 1999. *Mitochondria*. Wiley-Liss, New York.
- Schneider, S. Roessli, D. Excoffier, L. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Simonsen, K.L. Churchill, G.A. Aquadro, C.F. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics* 141: 413-429.
- Sivasundar, A. Bermingham, E. Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin, M. Hudson, R.R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Soares, M.G.M. 1979. Aspectos ecológicos (alimentação e reprodução) dos peixes do Igarapé do Porto, Aripuanã, MT. *Acta Amazônica* 9:325-352.
- Southwood, T.R.E. 1988. Tactics, strategies and templates. *Oikos*, Bonn, 52:3-18.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595
- Tajima, F. 1996. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.

- Technelysium Pty Ltd, 1998. 13 Ardlenathan ct, Helensvale, Queensland 4122, Australia.
- Templeton, A.R. 1993. The “Eve” hypotheses: A genetic critique and reanalysis. *American Anthropologist* 95(1): 51-72.
- Templeton, A.R. 1998. Nested Clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7:381-397.
- Templeton, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789-809.
- Templeton, A.R. Boerwinkle, E. Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonucleas mapping I. Basic theory and an analysis of alcohol desidrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343-351.
- Templeton, A.R. Crandall, K. A. Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Templeton, A.R. Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.
- Templeton, A. Routman, E. Thornton, K.R. 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Turner, T.F. McPhee, M.V. Campbell, P. Winemiller, K.O. 2004. Phylogeography and intraespecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology* 64: 186-201.
- Uieda, V.S. 1984. Ocorrência e distribuição dos peixes em um riacho de água doce. *Revista Brasileira de Biologia*, 44(2): 203-213.
- Vannote, R.L. Minshall, G.W. Cummins, K.W.;Sedell, J.R. Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37:130-137.
- Vari, R.P. 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. Pp.343-377 in: P.E. Vanzolini & W.R. Heyer (Eds.), *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 488 pp.
- Wallace, D.C., 1995. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. *Am. J. Hum. Genet.* 57:201-23
- Weitzman, S.H. Menezes, N.A. Weitzman, M.J. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on

distribution of the other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Pp. 379-427 in: P.E. Vanzolini & W.R. Heyer (eds.), Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 488 pp.

Weir, B.; Cockerham C.C, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-70.

Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago, IL.

Zardoya, R. Doadrio, I. 1998. Phylogenetic relationships of iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1365-1372

7 Anexo

Alinhamento das 175 seqüências com 805 bases do gene mitocondrial Citocromo B obtidas para os indivíduos analisados da espécie *Astyanax altiparanae*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
SJ1(1)	AAAATTGCTAACGATGCACTCATCGACCTACCTGCCCCCTCAAATATTTTCAGCATGATGAACTTTGGCTCCCTTCTACTCCTCTGCCTAATAATACAAA									
SJ1(2)									
SJ1(3)									
SJ1(4)									
SJ1(5)									
SJ1(6)									
SJ2(1)									
SJ2(2)									
SJ2(3)									
SJ2(4)							T		
SJ2(5)									
SJ2(6)									
SJ2(7)									
SJ2(8)									
SJ2(9)									
SJ2(10)			C					T	
SJ3(1)									
SJ3(2)			C						
SJ3(3)			C					T	
SJ3(4)									
SJ3(5)									
SJ3(6)									
SJ3(7)									
SJ3(8)									
SJ3(9)									
SJ3(10)									
BT1(1)									
BT1(2)									
BT1(3)									
BT1(4)									
BT1(5)									
BT1(6)									
BT1(7)									
BT1(8)									
BT1(9)									
BT1(10)									
BT2(1)									
BT2(2)		C		C				T	
BT3(1)									
BT4(1)									
BT4(2)									
BT4(3)									
BT4(4)			C					T	
BT4(5)									
BT4(6)									
BT4(7)									
BT4(8)									
BT4(9)									
BT4(10)									
BT5(1)									
BT6(1)							C		
BT6(3)									
BT6(4)									
BT6(5)			C					T	
BT6(6)			C					T	
BT6(7)			C						
BT6(8)		T							
BT6(9)									
BT6(10)									
AG1(1)									
AG1(2)									
AG1(3)									
AG1(4)									
AG1(5)									
AG6(1)									
AG2(1)	T								

AG2(2)
 AG2(3)
 AG2(4)
 AG2(5)
 AG3(1)
 AG4(1)
 AG4(2)C.....
 AG4(3)C.....
 AG4(4)C.....
 AG4(5)C.....
 AG4(6)C.....
 AG4(9)C.....T.....
 AG4(10)C.....T.....
 AG5(1)
 AG5(2)C.....T.....
 AG5(3)C.....T.....
 AG5(4)G.....
 AG5(5)
 AG5(6)C.....
 AG5(8)C.....T.....
 AG5(9)
 AG5(10)T.....
 PE1(1)
 PE1(2)
 PE1(3)
 PE1(5)
 PE1(6)
 PE1(7)
 PE1(8)
 PE1(10)
 PE1(11)
 PE1(12)
 PE1(13)G.....
 PE2(1)
 PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2)C.....T.....
 PP1(3)
 PP1(4)
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7)
 PP1(8)
 PP1(9)
 PP1(10)
 PP2(1)
 PP3(1)
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)
 MP2(1)
 MP2(2)
 MP3(1)C.....G.....T.....
 MP3(2)
 MP3(3)
 MP3(5)
 MP3(6)
 MP3(7)
 MP3(8)T.....
 MP3(9)T.....
 MP4(1)T.....
 AP1(1)C.....T.....
 AP1(3)
 AP2(2)C.....T.....
 PC1(1)G.....G.....
 PC1(3)C.....T.....
 PC1(4)
 PC1(7)A.....
 PC2(1)A.....
 PC2(2)C.....T.....
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10)
 TGL(1)

BT4(4)
BT4(5)
BT4(6)
BT4(7)
BT4(8)
BT4(9)
BT4(10)
BT5(1)
BT6(1)
BT6(3)
BT6(4)
BT6(5)
BT6(6) G
BT6(7)
BT6(8)
BT6(9)
BT6(10)
AG1(1)
AG1(2)
AG1(3)
AG1(4)
AG1(5)
AG6(1)
AG2(1)
AG2(2)
AG2(3)
AG2(4)
AG2(5)
AG3(1)
AG4(1)
AG4(2)
AG4(3)
AG4(4)
AG4(5) C
AG4(6) C
AG4(9)
AG4(10)
AG5(1)
AG5(2)
AG5(3)
AG5(4)
AG5(5)
AG5(6) C
AG5(8)
AG5(9)
AG5(10)
PE1(1)
PE1(2)
PE1(3)
PE1(5)
PE1(6)
PE1(7)
PE1(8)
PE1(10)
PE1(11)
PE1(12)
PE1(13) G
PE2(1)
PE2(2)
PE2(3)
PE3(1)
PP1(2)
PP1(3) C
PP1(4)
PP1(5)
PP1(6)
PP1(7)
PP1(8)
PP1(9)
PP1(10)
PP2(1)
PP3(1)
PP3(2)
PP3(3)
MP1(1)
MP2(1)
MP2(2)

MP3(1) G
 MP3(2) G
 MP3(3)
 MP3(5)
 MP3(6)
 MP3(7)
 MP3(8)
 MP3(9)
 MP4(1)
 AP1(1) G C
 AP1(3)
 AP2(2)
 PC1(1)
 PC1(3) G
 PC1(4)
 PC1(7)
 PC2(1)
 PC2(2)
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10)
 TG1(1)
 TG1(2)
 TG1(4) C
 TG1(5)
 TG1(6)
 TG1(9) AT
 TG1(10) G
 TG2(1)
 TG2(5)
 TG2(6)
 TG2(7) C
 TG2(8)
 TG2(9) C
 TG2(10) G
 TG3(2) G
 TG3(3)
 TG3(4)
 TG3(5)
 TG4(1)
 TG4(2)
 TG4(3)
 TG4(4)
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7) G
 PG1(2)
 PG1(3)
 PG1(4)
 PG1(7) G
 PG1(9)
 PG1(10)
 PG2(1) G T
 SG1(5) C

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
SJ1(1)	TATTCGAAATATACACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTTATCTGCATTACTTACACATTGGTCGAGGCCTTTACTACGGCTCCTACCTATATAAAGAA									
SJ1(2)										
SJ1(3)										
SJ1(4)										
SJ1(5)										
SJ1(6)										
SJ2(1)										
SJ2(2)										
SJ2(3)										
SJ2(4)										
SJ2(5)										
SJ2(6)										
SJ2(7)										
SJ2(8)										
SJ2(9)										
SJ2(10)										
SJ3(1)										
SJ3(2)										

SJ3(3) T. C. T.
 SJ3(4)
 SJ3(5)
 SJ3(6)
 SJ3(7)
 SJ3(8)
 SJ3(9)
 SJ3(10)
 BT1(1)
 BT1(2)
 BT1(3)
 BT1(4) C
 BT1(5)
 BT1(6)
 BT1(7)
 BT1(8)
 BT1(9)
 BT1(10)
 BT2(1)
 BT2(2) C. T.
 BT3(1)
 BT4(1)
 BT4(2)
 BT4(3)
 BT4(4) C. T.
 BT4(5)
 BT4(6)
 BT4(7)
 BT4(8)
 BT4(9)
 BT4(10)
 BT5(1)
 BT6(1) A. G. C.
 BT6(3)
 BT6(4)
 BT6(5) C. T.
 BT6(6) T.
 BT6(7) C. T.
 BT6(8)
 BT6(9)
 BT6(10)
 AG1(1)
 AG1(2) C.
 AG1(3)
 AG1(4)
 AG1(5)
 AG6(1)
 AG2(1)
 AG2(2)
 AG2(3)
 AG2(4)
 AG2(5) G.
 AG3(1)
 AG4(1)
 AG4(2) C. T.
 AG4(3) C. T.
 AG4(4) C. T.
 AG4(5) C. T.
 AG4(6) C. T.
 AG4(9) C. T.
 AG4(10) C. T.
 AG5(1)
 AG5(2) C. T.
 AG5(3) C. T.
 AG5(4) C.
 AG5(5)
 AG5(6) C. T.
 AG5(8) C. T.
 AG5(9)
 AG5(10)
 PE1(1)
 PE1(2)
 PE1(3)
 PE1(5)
 PE1(6)
 PE1(7)
 PE1(8)

PE1(10)
 PE1(11)
 PE1(12)
 PE1(13)
 PE2(1)
 PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2) C T
 PP1(3) C T
 PP1(4)
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7)
 PP1(8)
 PP1(9)
 PP1(10)
 PP2(1)
 PP3(1)
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)
 MP2(1)
 MP2(2)
 MP3(1) C T
 MP3(2) G T T G
 MP3(3) T
 MP3(5) T
 MP3(6)
 MP3(7) T
 MP3(8)
 MP3(9)
 MP4(1) G G
 AP1(1) C T
 AP1(3)
 AP2(2) C T
 PC1(1)
 PC1(3) C T
 PC1(4)
 PC1(7)
 PC2(1)
 PC2(2) C C
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10)
 TG1(1) C T
 TG1(2)
 TG1(4) C T
 TG1(5) C T
 TG1(6) C T
 TG1(9) G C C T
 TG1(10) C T
 TG2(1) C T
 TG2(5) C T
 TG2(6)
 TG2(7) C T
 TG2(8)
 TG2(9) C T
 TG2(10) C T
 TG3(2) C C T
 TG3(3) C
 TG3(4)
 TG3(5)
 TG4(1) C T
 TG4(2)
 TG4(3) C T
 TG4(4) C T
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7) C T
 PG1(2) CC T
 PG1(3) C T
 PG1(4)
 PG1(7) C A T
 PG1(9) C T

PG1(10)C.....T.....
 PG2(1)C.....T.....
 SG1(5)C.....T.....

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
SJ1(1)	ACATGAAACATTGGTGTGTCCTTCTTCTTTAGTAATAATAACTGCATTCGTTGGCTATGTTTTACCCTGAGGGCAGATATCTTTCTGGGGTGCCACAG									
SJ1(2)									
SJ1(3)								CT	
SJ1(4)									
SJ1(5)									
SJ1(6)									
SJ2(1)									
SJ2(2)									
SJ2(3)				A					
SJ2(4)									
SJ2(5)									
SJ2(6)							A		
SJ2(7)									
SJ2(8)				A					
SJ2(9)									
SJ2(10)									
SJ3(1)									A
SJ3(2)									
SJ3(3)									
SJ3(4)									
SJ3(5)									
SJ3(6)									
SJ3(7)									
SJ3(8)									
SJ3(9)									
SJ3(10)									
BT1(1)									
BT1(2)									
BT1(3)									
BT1(4)									
BT1(5)									
BT1(6)									
BT1(7)									
BT1(8)									
BT1(9)									
BT1(10)									
BT2(1)									
BT2(2)			G						
BT3(1)	A								
BT4(1)									
BT4(2)									
BT4(3)									
BT4(4)									
BT4(5)									
BT4(6)									
BT4(7)	A								
BT4(8)							A		
BT4(9)									
BT4(10)									
BT5(1)									
BT6(1)			C					T	
BT6(3)									
BT6(4)									
BT6(5)									
BT6(6)			G						
BT6(7)							A		
BT6(8)							A		
BT6(9)							A		
BT6(10)							A		
AG1(1)									
AG1(2)							A		
AG1(3)									
AG1(4)									
AG1(5)									
AG6(1)									
AG2(1)									
AG2(2)									
AG2(3)									
AG2(4)									
AG2(5)									
AG3(1)									

AG4(1)
 AG4(2)G.....
 AG4(3)G.....
 AG4(4)G.....
 AG4(5)G.....
 AG4(6)G.....
 AG4(9)G.....
 AG4(10)G.....
 AG5(1)
 AG5(2)G.....
 AG5(3)G.....
 AG5(4)
 AG5(5)
 AG5(6)G.....
 AG5(8)G.....
 AG5(9)
 AG5(10)
 PE1(1)
 PE1(2)
 PE1(3)A.....
 PE1(5)
 PE1(6)A.....
 PE1(7)
 PE1(8)
 PE1(10)
 PE1(11)
 PE1(12)
 PE1(13)
 PE2(1)
 PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2)G.....
 PP1(3)C.....
 PP1(4)
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7)
 PP1(8)
 PP1(9)
 PP1(10)
 PP2(1)
 PP3(1)
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)
 MP2(1)
 MP2(2)
 MP3(1)G.....
 MP3(2)
 MP3(3)
 MP3(5)
 MP3(6)
 MP3(7)
 MP3(8)C..C.....A.....
 MP3(9)C..C.....A.....
 MP4(1)C..C.....A.....
 AP1(1)T.....G.....A.....
 AP1(3)C..C.....A.....
 AP2(2)G.....A.....
 PC1(1)AC.....
 PC1(3)G.....
 PC1(4)
 PC1(7)C..C..C.....A.....
 PC2(1)C..C..C.....A.....
 PC2(2)G.....A..C.....
 PC2(6)AGT.....
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)A.....
 PC2(10)
 TG1(1)G.....T.....A.....
 TG1(2)
 TG1(4)G.....
 TG1(5)G.....
 TG1(6)G.....T.....A.....
 TG1(9)G.....

TG1(10)G.....
 TG2(1)G.....
 TG2(5)G.....
 TG2(6)A.....
 TG2(7)G.....
 TG2(8)
 TG2(9)G.....
 TG2(10)G.....
 TG3(2)G.....C.....
 TG3(3)
 TG3(4)A.....
 TG3(5)
 TG4(1)G.....
 TG4(2)
 TG4(3)G.....T.....
 TG4(4)G.....
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7)G.....
 PG1(2)G.....G.....
 PG1(3)G.....
 PG1(4)
 PG1(7)G.....
 PG1(9)G.....
 PG1(10)G.....
 PG2(1)G.....
 SG1(5)A.....A.....

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 SJ1(1) TAATCACCAATCTTCTCTCCGCAGTCCCTTATATAGGAGATTCTCTAGTACAATGAATTTGAGGCGGTTTCTCTGTTGATAACGCCACCCTAACTCGATT
 SJ1(2)
 SJ1(3)
 SJ1(4)
 SJ1(5)
 SJ1(6)
 SJ2(1)
 SJ2(2)
 SJ2(3)
 SJ2(4)
 SJ2(5)C.....
 SJ2(6)
 SJ2(7)
 SJ2(8)
 SJ2(9)T.....
 SJ2(10)G.....C.....
 SJ3(1)
 SJ3(2)T.....A.....A.....C.....
 SJ3(3)C.....
 SJ3(4)
 SJ3(5)
 SJ3(6)
 SJ3(7)C.....
 SJ3(8)
 SJ3(9)
 SJ3(10)
 BT1(1)
 BT1(2)
 BT1(3)
 BT1(4)
 BT1(5)
 BT1(6)
 BT1(7)
 BT1(8)
 BT1(9)
 BT1(10)
 BT2(1)
 BT2(2)C.....
 BT3(1)
 BT4(1)C.....
 BT4(2)
 BT4(3)
 BT4(4)C.....
 BT4(5)
 BT4(6)
 BT4(7)
 BT4(8)

BT4(9)G.....G.....A.....
 BT4(10)
 BT5(1)
 BT6(1)G.C..G.....
 BT6(3)
 BT6(4)C.....
 BT6(5)C.....
 BT6(6)C.....
 BT6(7)
 BT6(8)
 BT6(9)
 BT6(10)
 AG1(1)
 AG1(2)
 AG1(3)
 AG1(4)
 AG1(5)
 AG6(1)
 AG2(1)
 AG2(2)T.....
 AG2(3)
 AG2(4)
 AG2(5)
 AG3(1)
 AG4(1)C.....
 AG4(2)C.....
 AG4(3)C.....
 AG4(4)C.....
 AG4(5)C.....
 AG4(6)C.....
 AG4(9)
 AG4(10)
 AG5(1)C.....
 AG5(2)
 AG5(3)
 AG5(4)
 AG5(5)C.....
 AG5(6)
 AG5(8)
 AG5(9)
 AG5(10)
 PE1(1)
 PE1(2)
 PE1(3)
 PE1(5)
 PE1(6)
 PE1(7)
 PE1(8)
 PE1(10)
 PE1(11)
 PE1(12)
 PE1(13)
 PE2(1)
 PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2)
 PP1(3)
 PP1(4)
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7)
 PP1(8)
 PP1(9)
 PP1(10)
 PP2(1)
 PP3(1)C.....
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)A.....
 MP2(1)A.....C.....
 MP2(2)CA.....A.....
 MP3(1)
 MP3(2)CA.....A.....
 MP3(3)CA.....A.....
 MP3(5)CA.....A.....
 MP3(6)

MP3(7)CA.....A.....
 MP3(8)CA.....A.....
 MP3(9)CA.....A.....
 MP4(1)CA.....A.....
 AP1(1)C.....
 AP1(3)CA.....A.....
 AP2(2)C.....
 PC1(1)A.....
 PC1(3)C.....
 PC1(4)
 PC1(7)CA.....A.....
 PC2(1)CA.....A.....
 PC2(2)
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10)
 TG1(1)C.....
 TG1(2)C.....
 TG1(4)C.....
 TG1(5)C.....
 TG1(6)C.....
 TG1(9)C.....
 TG1(10)C.....
 TG2(1)C.....
 TG2(5)C.....
 TG2(6)C.....
 TG2(7)C.....
 TG2(8)
 TG2(9)C.....
 TG2(10)C.....
 TG3(2)
 TG3(3)
 TG3(4)CA.....A.....
 TG3(5)
 TG4(1)
 TG4(2)
 TG4(3)
 TG4(4)C.....
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7)C.....
 PG1(2)
 PG1(3)
 PG1(4)
 PG1(7)T.....T.....G.....
 PG1(9)
 PG1(10)
 PG2(1)
 SG1(5)

.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600.....
 SJ1(1) TTTTCGCCTTTCACCTTCCTTCTACCATTTGTAATTATGTCAGCAACTCTTCTTCACGCCCTCTTTCTTCATGAAACAGGATCAAATAACCCAACCTGGGTTA
 SJ1(2)
 SJ1(3)
 SJ1(4)
 SJ1(5)
 SJ1(6)
 SJ2(1)
 SJ2(2)
 SJ2(3)
 SJ2(4)
 SJ2(5)
 SJ2(6)
 SJ2(7)
 SJ2(8)
 SJ2(9)
 SJ2(10)
 SJ3(1)
 SJ3(2)
 SJ3(3)
 SJ3(4)
 SJ3(5)
 SJ3(6)
 SJ3(7)

SJ3(8)
 SJ3(9)
 SJ3(10)
 BT1(1)
 BT1(2)
 BT1(3)
 BT1(4)
 BT1(5)
 BT1(6)
 BT1(7)
 BT1(8)
 BT1(9)
 BT1(10)
 BT2(1)
 BT2(2)
 BT3(1)
 AG4(1)
 AG4(2)
 AG4(3)
 AG4(4)
 AG4(5)
 AG4(6)
 AG4(7)
 AG4(8)
 AG4(9)
 AG4(10) A
 BT5(1)
 BT6(1)
 BT6(3)
 BT6(4)
 BT6(5) T A
 BT6(6)
 BT6(7)
 BT6(8)
 BT6(9)
 BT6(10)
 AG1(1)
 AG1(2)
 AG1(3)
 AG1(4)
 AG1(5)
 AG6(1)
 AG2(1)
 AG2(2)
 AG2(3)
 AG2(4)
 AG2(5)
 AG3(1)
 AG4(1) G
 AG4(2)
 AG4(3)
 AG4(4) G
 AG4(5)
 AG4(6)
 AG4(9)
 AG4(10)
 AG5(1)
 AG5(2)
 AG5(3)
 AG5(4)
 AG5(5) G
 AG5(6)
 AG5(8)
 AG5(9)
 AG5(10)
 PE1(1)
 PE1(2)
 PE1(3)
 PE1(5)
 PE1(6)
 PE1(7)
 PE1(8)
 PE1(10)
 PE1(11)
 PE1(12)
 PE1(13)
 PE2(1) G

PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2)
 PP1(3)
 PP1(4)G.....
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7)
 PP1(8)
 PP1(9)
 PP1(10)
 PP2(1)
 PP3(1)
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)
 MP2(1)
 MP2(2)G.....
 MP3(1)
 MP3(2)
 MP3(3)
 MP3(5)
 MP3(6)
 MP3(7)
 MP3(8)
 MP3(9)
 MP4(1)
 AP1(1)
 AP1(3)
 AP2(2)T.....
 PC1(1)T.....
 PC1(3)
 PC1(4)
 PC1(7)
 PC2(1)
 PC2(2)
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10)
 TG1(1)
 TG1(2)
 TG1(4)G.....
 TG1(5)
 TG1(6)
 TG1(9)
 TG1(10)
 TG2(1)
 TG2(5)
 TG2(6)
 TG2(7)G.....
 TG2(8)
 TG2(9)G.....
 TG2(10)
 TG3(2)
 TG3(3)
 TG3(4)
 TG3(5)
 TG4(1)
 TG4(2)
 TG4(3)
 TG4(4)
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7)
 PG1(2)T.....
 PG1(3)T.....
 PG1(4)
 PG1(7)T.....
 PG1(9)T.....
 PG1(10)T.....
 PG2(1)T.....
 SG1(5)T.....

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SJ1(1)  AACTCAGACTCAGATAAAAATTCCTTCCACCCATACTTTTCCTATAAAGACCTTCTAGGTTTATAAATTATGCTTACTGCCCTAACATCACTAGCCTTAT
SJ1(2)  .....G.....
SJ1(3)  .....
SJ1(4)  .....G.....
SJ1(5)  .....
SJ1(6)  .....
SJ2(1)  .....
SJ2(2)  .....
SJ2(3)  .....
SJ2(4)  .....
SJ2(5)  .....
SJ2(6)  .....
SJ2(7)  .....C.....
SJ2(8)  .....
SJ2(9)  .....
SJ2(10) .....C.....
SJ3(1)  .....
SJ3(2)  .....C.....
SJ3(3)  .....C.....
SJ3(4)  .....
SJ3(5)  .....
SJ3(6)  .....
SJ3(7)  .....C.....C.....T.....
SJ3(8)  .....
SJ3(9)  .....
SJ3(10) .....
BT1(1)  .....
BT1(2)  .....
BT1(3)  .....
BT1(4)  .....
BT1(5)  .....
BT1(6)  .....
BT1(7)  .....
BT1(8)  .....
BT1(9)  .....
BT1(10) .....
BT2(1)  .....
BT2(2)  .....C.....
BT3(1)  .....
BT4(1)  .....
BT4(2)  .....
BT4(3)  .....
BT4(4)  .....C.....
BT4(5)  .....
BT4(6)  .....
BT4(7)  .....
BT4(8)  .....
BT4(9)  .....
BT4(10) .....
BT5(1)  .....
BT6(1)  .....
BT6(3)  .....
BT6(4)  .....C.....
BT6(5)  .....C.....
BT6(6)  .....C.....
BT6(7)  .....
BT6(8)  .....
BT6(9)  .....
BT6(10) .....
AG1(1)  .....
AG1(2)  .....
AG1(3)  .....
AG1(4)  .....
AG1(5)  .....
AG6(1)  .....
AG2(1)  .....
AG2(2)  .....
AG2(3)  .....
AG2(4)  .....G.....
AG2(5)  .....
AG3(1)  .....
AG4(1)  .....C.....
AG4(2)  .....C.....
AG4(3)  .....C.....
AG4(4)  .....C.....
AG4(5)  .....C.....

```

AG4(6) C
 AG4(9) C
 AG4(10)
 AG5(1) C
 AG5(2) G
 AG5(3)
 AG5(4)
 AG5(5) C
 AG5(6)
 AG5(8)
 AG5(9)
 AG5(10) C
 PE1(1) C
 PE1(2)
 PE1(3)
 PE1(5)
 PE1(6) C
 PE1(7)
 PE1(8)
 PE1(10)
 PE1(BT5)
 PE1(BT6)
 PE1(AG1)
 PE2(1)
 PE2(2)
 PE2(3)
 PE3(1)
 PP1(2)
 PP1(3)
 PP1(4)
 PP1(5)
 PP1(6)
 PP1(7) A
 PP1(8) A
 PP1(9)
 PP1(10) T
 PP2(1)
 PP3(1) C
 PP3(2)
 PP3(3)
 MP1(1)
 MP2(1) C
 MP2(2) C
 MP3(1) G
 MP3(2)
 MP3(3)
 MP3(5)
 MP3(6)
 MP3(7)
 MP3(8)
 MP3(9) A
 MP4(1)
 AP1(1) C
 AP1(3)
 AP2(2) C
 PC1(1)
 PC1(3) C
 PC1(4)
 PC1(7)
 PC2(1)
 PC2(2) A G
 PC2(6) A G
 PC2(7)
 PC2(8) G
 PC2(9)
 PC2(10)
 TG1(1) C
 TG1(2) C
 TG1(4) C
 TG1(5) C
 TG1(6) C
 TG1(9) C
 TG1(10) C
 TG2(1) C
 TG2(5) C
 TG2(6) C
 TG2(7) C

TG2(8)
 TG2(9)C.....
 TG2(10)C.....
 TG3(2)
 TG3(3)
 TG3(4)
 TG3(5)
 TG4(1)T.....
 TG4(2)
 TG4(3)
 TG4(4)C.....C.....
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7)C.....
 PG1(2)C.....C.....
 PG1(3)C.....C.....
 PG1(4)
 PG1(7)C.....C.....
 PG1(9)C.....C.....
 PG1(10)C.....C.....
 PG2(1)C.....C.....
 SG1(5)C.....C.....

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 SJ1(1) TTTCCCCAACCTCCTGGGAGACCCTGAAAATTTACGCCCGCCAACCCACTCGTAACACCACCCACATCAAACCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTA
 SJ1(2)
 SJ1(3)
 SJ1(4)
 SJ1(5)
 SJ1(6)
 SJ2(1)
 SJ2(2)
 SJ2(3)
 SJ2(4)
 SJ2(5)
 SJ2(6)
 SJ2(7)
 SJ2(8)
 SJ2(9)
 SJ2(10)T.....
 SJ3(1)
 SJ3(2)T.....
 SJ3(3)T.....
 SJ3(4)
 SJ3(5)
 SJ3(6)
 SJ3(7)T.....
 SJ3(8)
 SJ3(9)
 SJ3(10)
 BT1(1)
 BT1(2)
 BT1(3)
 BT1(4)
 BT1(5)
 BT1(6)
 BT1(7)
 BT1(8)
 BT1(9)
 BT1(10)
 BT2(1)
 BT2(2)T.....
 BT3(1)
 BT4(1)
 BT4(2)
 BT4(3)
 BT4(4)T.....
 BT4(5)
 BT4(6)
 BT4(7)
 BT4(8)
 BT4(9)
 BT4(10)
 BT5(1)
 BT6(1)
 BT6(3)

BT6(4)T.....T.....
BT6(5)T.....
BT6(6)T.....
BT6(7)
BT6(8)
BT6(9)
BT6(10)
AG1(1)
AG1(2)
AG1(3)
AG1(4)
AG1(5)
AG6(1)
AG2(1)
AG2(2)
AG2(3)
AG2(4)
AG2(5)
AG3(1)
AG4(1)T.....
AG4(2)T.....
AG4(3)T.....
AG4(4)T.....
AG4(5)T.....
AG4(6)T.....
AG4(9)T.....
AG4(10)
AG5(1)T.....
AG5(2)
AG5(3)
AG5(4)
AG5(5)T.....
AG5(6)
AG5(8)
AG5(9)
AG5(10)
PE1(1)
PE1(2)
PE1(3)
PE1(5)
PE1(6)
PE1(7)
PE1(8)
PE1(10)
PE1(11)
PE1(12)
PE1(13)
PE2(1)
PE2(2)
PE2(3)
PE3(1)
PP1(2)
PP1(3)
PP1(4)
PP1(5)
PP1(6)
PP1(7)
PP1(8)
PP1(9)
PP1(10)
PP2(1)
PP3(1)T.....
PP3(2)
PP3(3)
MP1(1)A.....
MP2(1)T.....
MP2(2)
MP3(1)
MP3(2)
MP3(3)
MP3(5)
MP3(6)
MP3(7)
MP3(8)
MP3(9)
MP4(1)
AP1(1)T.....

AP1(3)
 AP2(2) T
 PC1(1)
 PC1(3) T
 PC1(4)
 PC1(7)
 PC2(1)
 PC2(2)
 PC2(6)
 PC2(7)
 PC2(8)
 PC2(9)
 PC2(10) T
 TG1(1) T
 TG1(2) T
 TG1(4) T
 TG1(5) T
 TG1(6) T
 TG1(9) T
 TG1(10) T
 TG2(1) T
 TG2(5) T
 TG2(6) T
 TG2(7)
 TG2(8)
 TG2(9)
 TG2(10)
 TG3(2)
 TG3(3)
 TG3(4)
 TG3(5)
 TG4(1)
 TG4(2)
 TG4(3)
 TG4(4)
 TG4(5)
 TG4(6)
 TG4(7)
 PG1(2)
 PG1(3)
 PG1(4)
 PG1(7)
 PG1(9)
 PG1(10)
 PG2(1)
 SG1(5)

..... |
 SJ1(1) CGCCA
 SJ1(2)
 SJ1(3)
 SJ1(4)
 SJ1(5)
 SJ1(6)
 SJ2(1)
 SJ2(2)
 SJ2(3)
 SJ2(4)
 SJ2(5)
 SJ2(6)
 SJ2(7)
 SJ2(8)
 SJ2(9)
 SJ2(10)
 SJ3(1)
 SJ3(2)
 SJ3(3)
 SJ3(4)
 SJ3(5)
 SJ3(6)
 SJ3(7)
 SJ3(8)
 SJ3(9)
 SJ3(10)
 BT1(1)
 BT1(2)

BT1(3)
BT1(4)
BT1(5)
BT1(6)
BT1(7)
BT1(8)
BT1(9)
BT1(10)
BT2(1)
BT2(2)
BT3(1)
BT4(1)
BT4(2)
BT4(3)
BT4(4)
BT4(5)
BT4(6)
BT4(7)
BT4(8)
BT4(9)
BT4(10)
BT5(1)
BT6(1)
BT6(3)
BT6(4)
BT6(5)
BT6(6)
BT6(7)
BT6(8)
BT6(9)
BT6(10)
AG1(1)
AG1(2)
AG1(3)
AG1(4)
AG1(5)
AG6(1)
AG2(1)
AG2(2)
AG2(3)
AG2(4)
AG2(5)
AG3(1)
AG4(1)
AG4(2)
AG4(3)
AG4(4)
AG4(5)
AG4(6)
AG4(9)
AG4(10)
AG5(1)
AG5(2)
AG5(3)
AG5(4)
AG5(5)
AG5(6)
AG5(8)
AG5(9)
AG5(10)
PE1(1)
PE1(2)
PE1(3)
PE1(5)
PE1(6)
PE1(7)
PE1(8)
PE1(10)
PE1(11)
PE1(12)
PE1(13)
PE2(1)
PE2(2)
PE2(3)
PE3(1)
PP1(2)
PP1(3)

PP1(4)
PP1(5)
PP1(6)
PP1(7)
PP1(8)
PP1(9)
PP1(10)
PP2(1)
PP3(1)
PP3(2)
PP3(3)
MP1(1)
MP2(1)
MP2(2)
MP3(1)
MP3(2)
MP3(3)
MP3(5)
MP3(6)
MP3(7)
MP3(8)
MP3(9)
MP4(1)
AP1(1)
AP1(3)
AP2(2)
PC1(1)
PC1(3)
PC1(4)
PC1(7)
PC2(1)
PC2(2)
PC2(6)
PC2(7)
PC2(8)
PC2(9)
PC2(10)
TG1(1)
TG1(2)
TG1(4)
TG1(5)
TG1(6)
TG1(9)
TG1(10)
TG2(1)
TG2(5)
TG2(6)
TG2(7)
TG2(8)
TG2(9)
TG2(10)
TG3(2)
TG3(3)
TG3(4)
TG3(5)
TG4(1)
TG4(2)
TG4(3)
TG4(4)
TG4(5)
TG4(6)
TG4(7)
PG1(2)
PG1(3)
PG1(4)
PG1(7)
PG1(9)
PG1(10)
PG2(1)
SG1(5)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)