

**THATIANA VANESSA SORIA**

**DIVERSIDADE EM SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO  
CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL DE  
POPULAÇÕES DE *Astyanax* DA BACIA DO ALTO  
RIO PARANÁ**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
OUTUBRO – 2004**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**THATIANA VANESSA SORIA**

**DIVERSIDADE EM SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO  
CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL DE  
POPULAÇÕES DE *Astyanax* DA BACIA DO ALTO  
RIO PARANÁ**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de Mestre.**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
OUTUBRO – 2004**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S714d Soria, Thatiana Vanessa  
Diversidade em seqüências da região controle do DNA mitocondrial de populações de *Astyanax* da bacia do alto Rio Paraná / Thatiana Vanessa Soria. -- Maringá : [s.n.], 2004.  
47 f.

Orientador : Prof. Dr. Alberto José Prioli; Co-orientadores Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior e Erasmo Renesto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2004.

1. *Astyanax altiparanae*. 2. *Astyanax asuncionensis*. 3. DNA mitocondrial - *Astyanax*. 4. Biologia Molecular. Universidade Estadual de Maringá. Pós-graduação em Genética e Melhoramento.

CDD 21.ed. 572.8

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte  
(A autora)

Aos meus pais Luis Alberto Soria e Vera Gessi Soria e meus irmãos Alexander e

Natasha.

Ao meu filho Raphael.

## AGRADECIMENTOS

Deus.

Professor Dr. Alberto José Prioli, orientador, mestre, modelo, sempre comprometido em oferecer o que possui de melhor. Obrigada pela atenção, motivação e confiança em mim depositada para a execução deste trabalho.

Àqueles que com seu apoio e amizade compartilham suas vidas e são coadjuvantes na realização de sonhos. Destaco a amiga e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Pinto Prioli; as amigas, para todas as horas, Léia e Talge e a todos os colegas e estagiários do Laboratório de Genética.

Laudenir M. Prioli pelas valiosas sugestões e auxílio.

Carla Simone Pavanelli, pela colaboração nas análises morfológicas dos espécimes de peixes.

Sebastião Rodrigues, Edson Kiyoshi Okada, Horácio F. Júlio Jr., Simionato pelo auxílio nas coletas do material biológico.

Querido companheiro Murilo, pelo apoio, ajuda e paciência nos momentos difíceis de realização deste trabalho e constante incentivo.

Meus familiares que me apoiaram e contribuíram nos momentos difíceis de realização deste trabalho.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização desta tese.

Ao Nupelia (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura) pelo apoio irrestrito.

Furnas Centrais Elétricas S/A

Colegas do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, cujo convívio e troca de experiência é sempre salutar. Obrigada pelas sugestões, companheirismo e estímulo.

Funcionários do Nupelia, pelo apoio e atendimento ímpar e pelo alto padrão de qualidade de seus serviços.

Queridos mestres do curso de Pós-Graduação Genética e Melhoramento pelos ensinamentos recebidos.

CAPES pelo auxílio financeiro.

Às demais pessoas que, direta ou indiretamente, acreditaram e contribuíram para a execução deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Thatiana Vanessa Soria, filha de Luis Alberto Soria e Vera Gessi Soria, nasceu em São Paulo-SP, no dia sete de janeiro de 1978.

Diplomou-se em Ciências Biológicas, habilitações Licenciatura e Bacharelado, no ano de 2002 pela Universidade Estadual de Maringá.

Em outubro de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. ÁREAS DE COLETA .....	10
3.1.1. Reservatório de Itaipu .....	10
3.1.2. Planície inundação do alto rio Paraná .....	12
3.1.3. Reservatório de Barra Bonita .....	12
3.1.4. Água Limpa .....	13
3.1.5. Rio Manso e Rio Cuiabá.....	13
3.2. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	13
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL .....	13
3.4. PCR E SEQÜENCIAMENTO DE DNA MITOCONDRIAL .....	14
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## RESUMO

SORIA, THATIANA VANESSA, M.S., Universidade Estadual de Maringá, novembro de 2004. **Diversidade em seqüências da região controle do DNA mitocondrial de populações de *Astyanax* da Bacia do Alto Rio Paraná.** Professor Orientador: Alberto José Prioli; Professores Conselheiros: Horácio Ferreira Júlio Júnior e Erasmo Renesto.

*Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000, anteriormente conhecida como *Astyanax bimaculatus*, é uma espécie de peixe existente na bacia do alto rio Paraná. Em um estudo prévio, análises de RAPD e da seqüência hipervariável da região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial (mtDNA) revelaram alta similaridade genética entre uma população introduzida no Rio Iguaçu e populações de *A. altiparanae* dos rios Keller e Pirapó, afluentes do alto Paraná. No presente trabalho, seqüências nucleotídicas da região controle do mtDNA foram utilizadas para analisar a diversidade genética entre populações de *A. altiparanae* amostradas em diversas localidades da bacia do alto rio Paraná e de uma população de *A. asuncionensis* da sub-bacia do rio Paraguai dentro da bacia hidrográfica da província Parano-Platense. Este trabalho tem o objetivo de contribuir para melhor caracterizar a espécie *A. altiparanae* e verificar a possibilidade de *A. asuncionensis* ter se estabelecido no alto rio Paraná. A espécie *A. asuncionensis* era, até recentemente, identificada como sendo *A. bimaculatus*. Análises morfológicas identificaram todos os exemplares amostrados na bacia do alto Paraná como *A. altiparanae* e aqueles amostrados na sub-bacia do rio Paraguai foram identificados como *A. asuncionensis*. As seqüências *D-loop* analisadas apresentaram sítios polimórficos dentro de cada espécie e entre estas duas espécies de *Astyanax*, que são altamente aparentadas. As distâncias

genéticas revelaram que a população de *A. altiparanae* da planície de inundação do alto Paraná, das proximidades Guaíra e acima do reservatório de Itaipu consistem, na realidade, de dois grupos distintos de haplótipos ocorrendo em simpatria na região. O grupo menos freqüente é altamente semelhante aos haplótipos previamente identificados nos rios Keller, Pirapó e Iguaçu. Por outro lado, o grupo predominante é diferenciado por significativo polimorfismo na seqüência *D-loop* analisada. O grupo de haplótipos de *A. altiparanae* predominante na planície e na região próxima de Itaipu apresentou-se bem característico desta região, não tendo sido ainda encontrado nos outros locais estudados dentro da bacia do alto Paraná. Os dados de diversidade genética poderiam ser explicados por altos níveis de polimorfismo dentro da espécie *A. altiparanae* derivados de duas populações ancestrais geneticamente diferenciadas. Além disso, deve ser também considerada a hipótese de ocorrência de uma espécie ainda não diagnosticada neste trecho do rio Paraná. Se esta segunda hipótese for verdadeira, seria bem possível que esta espécie não diagnosticada teria sido introduzida nesta região do alto Paraná e que os marcadores morfológicos disponíveis não seriam suficientes para distingui-la da espécie *A. altiparanae*.

## ABSTRACT

SORIA, THATIANA VANESSA, M.S., Universidade Estadual de Maringá, November 2004. **Diversity in the sequence of mitochondrial control region of *Astyanax* of Upper Paraná River basin.** Adviser: Alberto José Prioli; Committee Members: Horácio Ferreira Júlio Júnior e Erasmo Renesto.

A fish species considered typical of the Upper Paraná River basin *is the species *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000, previously known as *Astyanax bimaculatus*. In a previous study, molecular markers have demonstrated high genetic similarities among a population introduced in the Iguazu River and *A. altiparanae* populations from Keller and Pirapó rivers from the Upper Paraná River basin. In the present work, sequences from the mitochondrial DNA control region (D-loop) were used to evaluate the genetic diversity among *A. altiparanae* populations sampled in several regions of the Upper Paraná River basin and one *A. asuncionensis* population from the Paraguay River sub-basin, which belongs to the Medium Paraná basin. This work attempts to contribute for a better characterization of *A. altiparanae* species and to evaluate the possibility that *A. asuncionensis* was introduced in the Upper Paraná River basin. This species, like *A. altiparanae*, had already been identified as *A. bimaculatus*. All specimens from Upper Paraná were identified as *A. altiparanae* and those ones from Medium Paraná were identified as *A. asuncionensis*, on basis of morphological traits. D-loop sequences were polymorphic within each species and also between these two highly related *Astyanax* species. Genetic distances inferred from mitochondrial DNA sequences revealed that the sampled population from the floodplain of Upper Paraná River, as well as the region downstream the floodplain, consisted indeed*

of two distinct groups of haplotypes, which are existing in sympatry in this region. The less frequent haplotype is highly similar to those of Keller, Pirapó, and Iguazu rivers, while the other is genetically differentiated by a significant D-loop polymorphism. The haplotype group predominant in the floodplain and in the area closer to Itaipu was typical of this region, and so far it has not been found in other places of the Upper Paraná River, where it has been studied. The genetic diversity revealed in this analysis could represent a high level of intraspecific polymorphism originated from two diverse ancestral populations. Another possible explanation could be the existence of an undiagnosed species in the floodplain of Upper Paraná River. It is conceivable that this hypothetical undiagnosed species could have been introduced in the floodplain, and it could not be discriminated from *A. altiparanae* on basis of the currently available morphological markers.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a construção de barragens de usinas hidrelétricas, a redução da mata ciliar e a crescente densidade populacional humana têm causado um imenso impacto no ecossistema aquático. As barragens se constituem em novas barreiras que impedem a migração natural de muitas espécies e podem isolar populações. Por outro lado, o intenso represamento dos rios pode levar à eliminação de barreiras geográficas naturais, permitindo assim a introdução de espécies em regiões antes inacessíveis. Em ambos os casos, os impactos ambientais podem levar a conseqüências populacionais e genéticas não reversíveis, que podem incluir até a extinção de espécies menos aptas a suportar essas alterações (Agostinho *et al.*, 1992, 1993; Agostinho e Julio Jr, 1999; Oliveira *et al.*, 2002).

Em poucas décadas, a maior parte da província do alto rio Paraná foi severamente impactada pela construção de muitas usinas hidrelétricas. Atualmente, o alto rio Paraná encontra-se barrado à jusante pela Usina Hidroelétrica de Itaipu e acima pelas usinas de Porto Primavera, Jupia e Ilha Solteira. Atualmente, o alagamento anual da planície de inundação do alto rio Paraná está sob a influência direta da abertura e fechamento das comportas das barragens de Porto Primavera e de outras situadas acima, especialmente no rio Grande e nos afluentes da margem esquerda. (Agostinho *et al.*, 1993; Agostinho e Julio Jr, 1999; Oliveira *et al.*, 2002).

A planície do rio Paraná é uma ampla área que compreendia o segmento entre Três Lagoas (MS) e Guaíra (PR). Parte da planície de inundação do alto rio

Paraná, foi inundada pelo reservatório de Porto Primavera e Itaipu. Atualmente, o trecho entre estes reservatórios é o único remanescente de água corrente deste rio no território brasileiro. Sua margem direita, no Estado do Mato Grosso do Sul, usualmente é inundada durante a estação chuvosa anual. Durante a estação seca, grande quantidade de água fica retida em lagoas temporárias e permanentes. Atualmente, o ecossistema da planície de inundação constitui uma Área de Proteção Ambiental (APA) do Brasil (Agostinho *et al.*, 1997).

Com o fechamento da barragem e enchimento do reservatório de Itaipu, em 1982, os saltos de Sete Quedas ficaram submersos. Como consequência, um trecho de aproximadamente 150 km da província Parano-Platense foi incorporada à província do alto rio Paraná. Portanto, a ictiofauna atual da planície de inundação do alto rio Paraná é peculiar, porque durante os últimos 20 anos várias espécies da província Parano-Platense têm coexistido com a ictiofauna local. Levantamentos realizados nos últimos anos na planície de inundação do alto rio Paraná identificaram mais de 170 espécies de peixes. Destas espécies, pelo menos 35 foram introduzidas após o fechamento da barragem de Itaipu (Agostinho *et al.*, 2003; Júlio Jr. e Agostinho, 2003). Além disso, várias outras espécies de peixes, originárias de outras bacias brasileiras e de outros países, foram introduzidas com objetivo de estocagem e/ou repovoamento (Agostinho *et al.*, 2003). As espécies *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (2000) são parte da ictiofauna local da planície de inundação do alto rio Paraná.

*A. altiparanae* é uma espécie endêmica da província do alto Paraná, não tendo sido encontrada na província Parano-Platense. Recentemente, características morfológicas e marcadores moleculares identificaram a espécie *A. altiparanae* no rio Iguaçu (Graça e Pavanelli, 2002; Prioli *et al.*, 2002). Marcadores

RAPD e do DNA mitocondrial (mtDNA) demonstraram que a população de *A. altiparanae* do rio Iguaçu foi introduzida a partir da província do alto rio Paraná e sugeriram que esta introdução deve ter ocorrido recentemente (Prioli *et al.*, 2002). A espécie *A. altiparanae*, que é bastante abundante e de alta importância na cadeia alimentar, é ainda pouco conhecida do ponto de vista genético-populacional.

Técnicas moleculares associadas com análises morfológicas têm sido aplicadas, com eficácia, à sistemática de peixes. Marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizados para caracterizar a biodiversidade e a estrutura genética de populações de peixes. Entre os marcadores moleculares, seqüências do mtDNA têm se mostrado uma poderosa metodologia para estudos da variação genética intra e interespecífica.

Neste trabalho, seqüências nucleotídicas da região controle do mtDNA foram utilizadas para analisar a diversidade genética entre populações de *A. altiparanae* de diversas localidades da província do alto rio Paraná e de uma população de *A. asuncionensis* da sub-bacia do rio Paraguai. Este trabalho pretende contribuir para melhor caracterizar a espécie *A. altiparanae* e verificar a possibilidade de *A. asuncionensis* ter se estabelecido no alto rio Paraná.



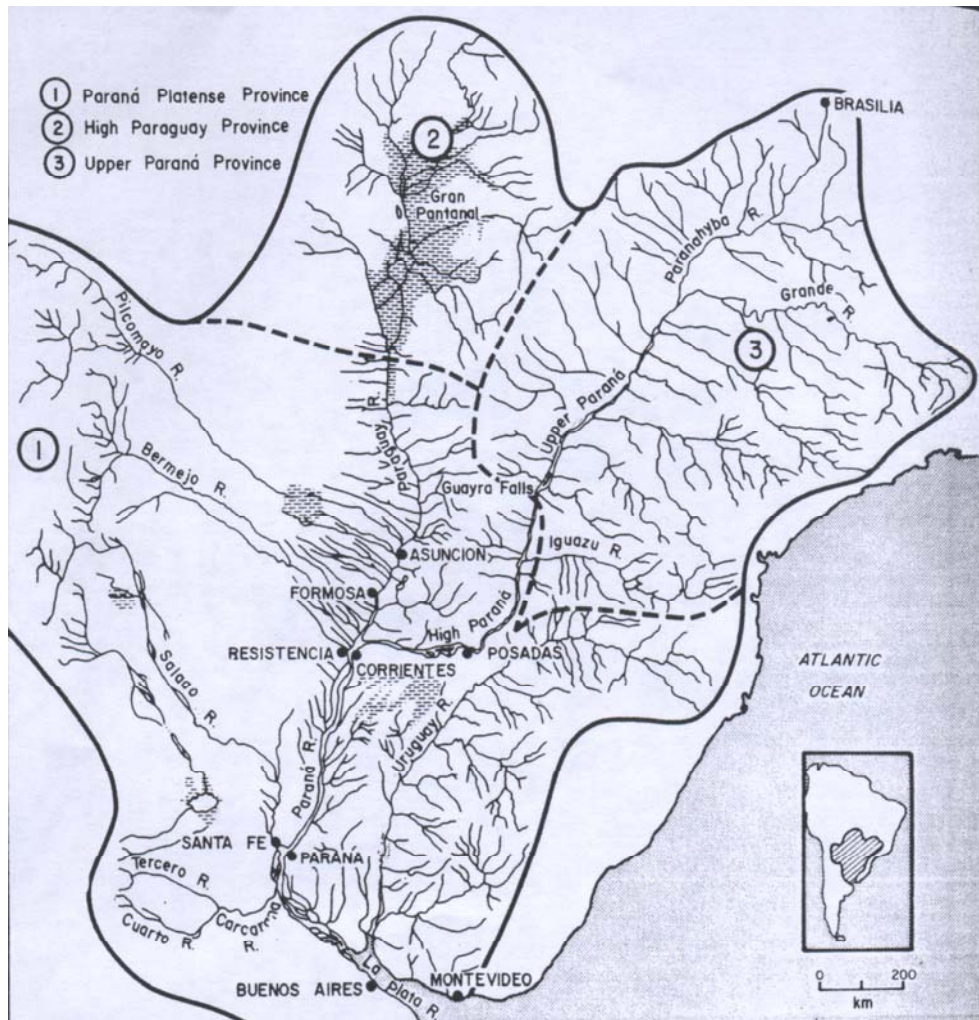
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Characidae é considerada a mais complexa família dentro da ordem Characiformes, com 250 gêneros e 30 subfamílias (Britski *et al.*, 1988). Apresenta cerca de 952 espécies descritas mais uma estimativa de 400 não identificadas (Reis *et al.*, 2003) na região Neotropical, das quais aproximadamente 200 foram analisadas citogeneticamente. Estas espécies compartilham uma característica marcante na maioria dos indivíduos analisados, que é a presença de um par de cromossomos meta/submetacêntricos, normalmente maior que o complemento. Inclui peixes de hábitos variados, os quais exploram diversos ambientes. Um dos gêneros mais estudados dentro dessa família é o *Astyanax* Baird e Girard, 1854, que constitui o maior e mais diversificado grupo (Fink e Fink, 1981; Nelson, 1994), e é largamente distribuído pelo território das Américas do Sul e Central. No Brasil são conhecidos como “lambaris”.

Cerca de uma centena de espécies e subespécies estão descritas no gênero *Astyanax*, mas muitos aspectos taxonômicos ainda são desconhecidos. Morfologicamente caracterizam-se por serem peixes de pequeno porte (aproximadamente 10 cm), apresentarem linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas fileiras e escamas cobrindo a base dos raios da nadadeira caudal. Quanto aos hábitos alimentares são peixes generalistas, incluindo na sua dieta pequenos peixes, vegetais delicados, insetos e larvas. A reprodução ocorre em todas as épocas do ano (Garutti e Britski, 2000).

Bonetto (1986) faz uma revisão da análise detalhada de Ringuelet (1975) que reorganizou a Bacia do Paraná em três Províncias ictiofaunística:

- a. Província Parano-Platense: do extremo sul da Bacia do Paraná, ao longo do rio Paraguai até a Bahia Negra e ao longo do rio Paraná até as cachoeiras de Guaíra, e no resto do sistema de La Plata;
- b. Província do Alto Paraguai: desde acima do alcance da Bacia do Paraguai até a Bahia Negra e;
- c. Província do Alto Paraná: desde acima do alcance da Bacia Paraná até as cachoeiras de Guaíra (Sete Quedas). (Figura 1)



**Figura 1.** Províncias ictiofaunísticas da Bacia do rio Paraná.

Na província do alto rio Paraná ocorrem várias espécies de *Astyanax*, incluindo uma popularmente conhecida como “tambíú” ou “lambari-de-rabo-

amarelo”. Esta espécie, que era previamente identificada como *Astyanax bimaculatus*, teve sua taxonomia revisada por Garutti e Britski (2000) e foi descrita como a nova *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000. Atualmente, tem sido admitido que *A. bimaculatus* não ocorre na província do alto rio Paraná e que *A. altiparanae* representa um exemplo do endemismo ictiofaunístico decorrente do isolamento dessa província desde sua formação (Garutti and Britski, 2000).

Estudos prévios de citogenética em *Astyanax* revelaram uma alta variabilidade cariotípica inter e intraespecífica (Morelli *et al.*, 1983; Daniel-Silva, 1996; Maistro *et al.*, 2000; Fernandes, 2002). Contudo, ainda existem poucas informações sobre diversidade genética, estrutura de populações e relações evolutivas entre as espécies compreendidas no gênero *Astyanax*. Além disso, não há evidências de monofilia para o gênero *Astyanax*, acreditando-se ser constituído por linhagens evolutivas independentes (Weitzman e Fink, 1983; Zanata, 1995; Weitzman e Malabarba, 1998).

Técnicas de biologia molecular têm sido ferramentas úteis para o estudo da variabilidade genética em populações naturais, através da detecção de marcadores moleculares. Entre as metodologias de análise molecular, que têm sido crescentemente empregadas, aquelas baseadas em fragmentos de DNA amplificados com a técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornaram possíveis estudos genético-moleculares, envolvendo um grande número de indivíduos. Isso se deu graças à taxa de polimorfismo do DNA que associado a outros estudos mostrou-se capaz de contribuir fortemente no reconhecimento da diversidade de grupos taxonômicos, incluindo-se espécies.

Vários marcadores que dependem de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) já foram utilizados em *Astyanax*. Utilizando marcadores RAPD e análises de

seqüências nucleotídicas do mtDNA, Prioli (2001) identificou a ocorrência da espécie *A. altiparanae* no rio Iguaçu, que até então era identificada como sendo *A. bimaculatus*. Os resultados demonstraram que a população analisada de *A. altiparanae* na bacia do Iguaçu foi introduzida a partir da província do alto rio Paraná. Além disso, foram realizadas também análises de relações filogenéticas entre *A. altiparanae* e as espécies *Astyanax* sp B, *Astyanax* sp C e *Astyanax* sp F, endêmicas do rio Iguaçu. Os resultados com RAPD foram confirmados com seqüências nucleotídicas do gene *rRNA12S* do mtDNA. Evidenciou-se que, entre as espécies endêmicas do Iguaçu, B e C são as que apresentam maior grau de parentesco. Em outro estudo, foi também demonstrado que há um distanciamento genético da espécie *A. altiparanae* das demais espécies endêmicas do Iguaçu, e uma alta similaridade genética entre as populações de *A. altiparanae* do rio Iguaçu e dos rios Pirapó e Keller, afluentes do Ivaí e Paranapanema, respectivamente (Prioli *et al.*, 2002).

Segundo Matoso (2002) e Matoso *et al.* (2004), as técnicas RAPD, RFLP e seqüenciamento do gene *rRNA12S* do mtDNA forneceram um excelente referencial teórico e bom indicativo sobre a estrutura genética de uma espécie de *Astyanax* que ocorre no Parque Estadual de Vila Velha. Foi evidenciado que há maior variabilidade genética na população amostrada do rio Tibagi e o compartilhamento da base genética similar nas populações do Parque Estadual de Vila Velha. Outro tipo de marcador molecular, os locos microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), que são marcadores nucleares co-dominantes, ainda têm sido pouco utilizados em estudos de *Astyanax*, possivelmente por questões de custo para o seu desenvolvimento. Os segmentos formados por blocos de microssatélites são relativamente pequenos (Raissmann *et al.*, 1992). Strecker *et*

*al.* (2003) utilizaram microssatélites para avaliação da diferenciação genética entre populações de *Astyanax mexicanus* que vivem em grutas e rios do México. Os microssatélites revelaram uma baixa variabilidade entre as populações das grutas exceto em uma delas, e ainda uma alta variabilidade quando comparadas às populações dos rios e das grutas. Supõe, então, que essa baixa diversidade em populações das grutas possa ser resultado de efeito do fundador.

Outro importante marcador molecular é o DNA mitocondrial que, em animais, vem sendo bastante usado em estudos evolutivos. Como marcador molecular, o mtDNA apresenta várias características convenientes e interessantes, tais como herança predominantemente uniparental materna, taxa relativamente rápida de substituição de bases, pouca recombinação e fácil isolamento (Avice *et al.*, 1987; Wolstenholme, 1992). O mtDNA provou ser um eficiente marcador para estudos de estrutura de população, variação geográfica e caracterização de espécies (Agnèse *et al.*, 1997; Graves, 1998; Sivasundar *et al.*, 2001).

O DNA mitocondrial é uma molécula de DNA pequena e circular de dupla hélice com tamanho variável (14 a 40 Kb). Caracteriza-se por não possuir histonas, tampouco sistema de reparo, ficando exposto à ação degenerativa de radicais livres de oxigênio gerados pelo processo de fosforilação oxidativa (Chinnery *et al.*, 2000). Análises do genoma mitocondrial constituem uma importante ferramenta para a investigação da evolução animal, bem como fitogeográfica, genética populacional e filogenética (Rokas *et al.*, 2003). Ele apresenta organização genômica compacta, ausência de íntrons, poucas regiões intergênicas, haploidia, ausência de recombinação, alta eficiência, e raramente

apresenta seqüências nucleotídicas duplicadas e seqüências não codificadoras (Meyer, 1994; Boore, 1999; Garesse, 1997).

Estudos de variação genética inter e intraespecífica têm utilizado variações na seqüência de nucleotídeos da região controle do DNA mitocondrial como marcadores. A região controle é a maior região não codificadora do mtDNA e também a mais variável do genoma mitocondrial dos metazoários, incluindo os peixes. É caracterizado pelo *displacement loop* (D-loop), que corresponde à região de origem de replicação da fita H do mtDNA (Meyer, 1994). A taxa de evolução da região controle é de duas a cinco vezes mais alta do que a dos genes que codificam proteínas mitocondriais, acumulando mutações principalmente na extremidade 5'. Portanto, a região controle tem sido a principal seqüência do mtDNA utilizada em estudos da variação genética intraespecífica e para a avaliação do parentesco entre espécies muito próximas, incluindo espécie de peixes (Meyer, 1994; Faber e Stepien, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Prioli *et al.*, 2002; Rognon e Guyomard, 2003).

Uma técnica molecular utilizada em *Astyanax* com grande êxito e que não depende do PCR foi RFLP (Moysés e Almeida–Toledo, 2002) em mtDNA. Esta técnica indicou um número expressivo de pontos mutacionais na região D-loop durante a história evolutiva de cinco espécies de *Astyanax* analisadas (*A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. lacustris*, *A. scabripinnis*, *A. schubarti*) com 10 enzimas de restrição.

Estudos adicionais no gênero *Astyanax* e, em particular, na espécie *A. altiparanae* certamente poderão gerar informações essenciais para melhor compreender a taxonomia desta espécie e também a variabilidade genética de populações de diversos ambientes.

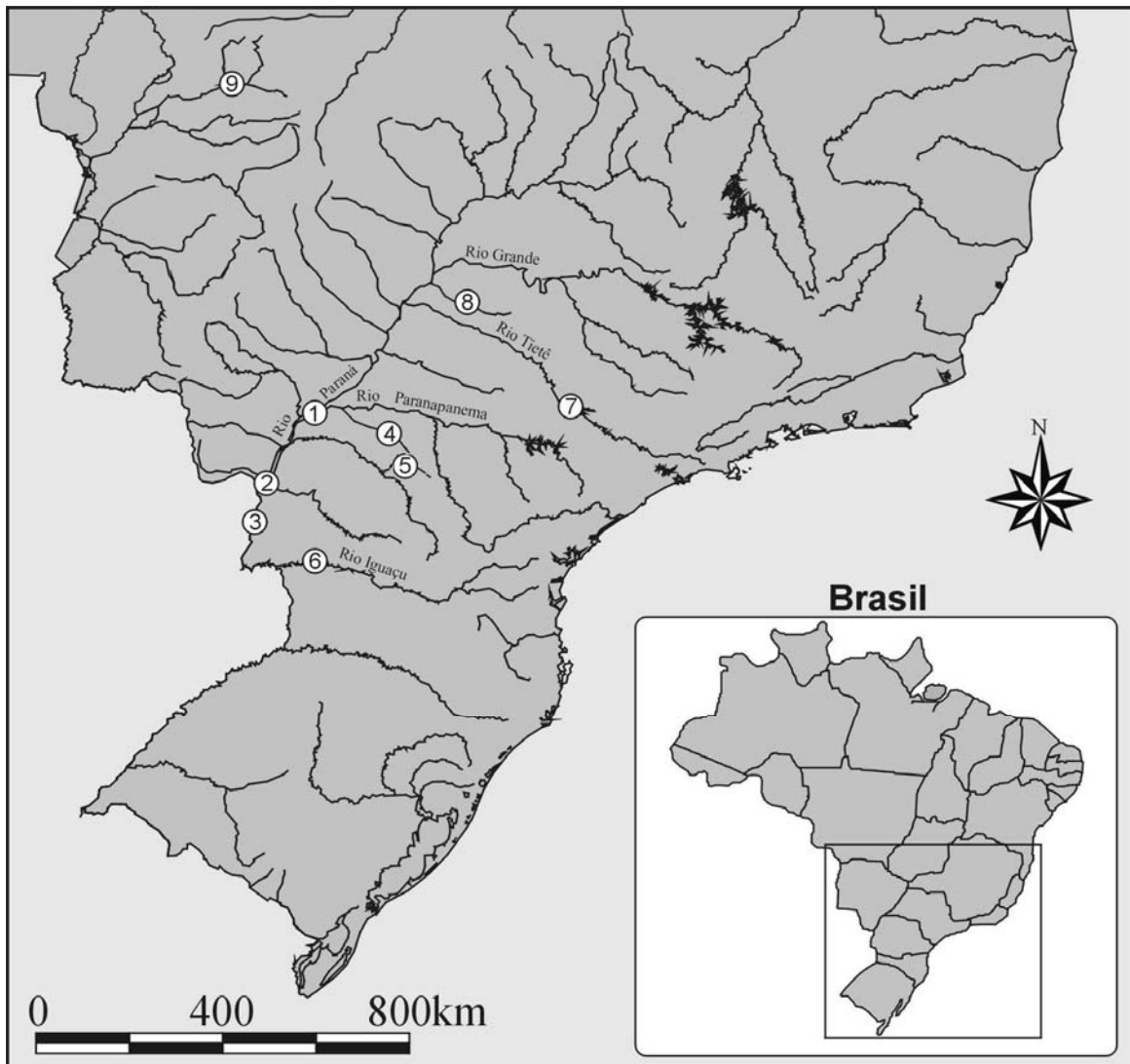
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ÁREAS DE COLETA

Exemplares de *Astyanax altiparanae* foram coletados em cinco localidades da província do alto rio Paraná, acima da região dos antigos saltos de Sete Quedas. No rio Paraná foram realizadas coletas em Guaíra (GU), no reservatório de Itaipu e em Porto Rico (PR), na planície de inundação do alto rio Paraná. Na província do alto rio Paraná também foram coletados indivíduos no reservatório de Barra Bonita (BB) no rio Tietê e na represa municipal de Monte Aprazível (MA), ambos locais no Estado de São Paulo. Foi selecionado um ponto de coleta em Entre Rios (ER), no segmento do rio correspondente ao médio rio Paraná e que foi incorporado ao alto rio Paraná, após a formação do reservatório de Itaipu. Espécimes de *A. asuncionensis* foram coletados no rio Manso e rio Cuiabá (CB), na sub-bacia do rio Paraguai. Os pontos de coleta estão indicados na Figura 2.

##### 3.1.1. Reservatório de Itaipu

O reservatório de Itaipu corresponde ao segmento do médio rio Paraná, na fronteira Brasil-Paraguai, que passou a ter continuidade com o alto rio Paraná depois da formação do lago. Está localizado, entre os paralelos 24° 05' e 25° 33' de latitude Sul e entre os meridianos 54° 00' e 54 °37' de longitude Oeste. Esse trecho situa-se entre a foz do rio Piquiri e a do rio Iguaçu no Estado do Paraná, respectivamente nos municípios de Guaíra e de Foz do Iguaçu.



**Figura 2.** Área de coleta de *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*. Os números correspondem aos pontos de coleta: **(1)** Planície de inundação do alto rio Paraná (região de Porto Rico-PR); **(2)** Itaipu –município de Guaíra-PR; **(3)** Itaipu – município de Entre Rios do Oeste-PR; **(4)** rio Pirapó (região de Maringá-PR); **(5)** rio Keller (Marialva-PR); **(6)** rio Iguaçu; **(7)** reservatório de Barra Bonita-SP (rio Tietê); **(8)** rio Água Limpa (região de Monte Aprazível-SP) e **(9)** sub-bacia do rio Paraguai-MT (rio Manso e rio Cuiabá).

No reservatório de Itaipu foram coletados e analisados cinco exemplares de *A. altiparanae* no município de Entre Rios do Oeste (PR). Também foram coletados e analisados cinco indivíduos no reservatório de Itaipu na altura do município de Guaíra, no estado do Paraná.



### **3.1.2. Planície inundação do alto rio Paraná**

O Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura – Nupélia – da Universidade Estadual de Maringá possui uma base avançada no município de Porto Rico (PR) (22° 47' 37" Sul e 53° 19' 03" Oeste). Esta área localiza-se imediatamente a jusante da barragem de Porto Primavera, cerca de 200 km a montante do remanso do reservatório de Itaipu, e pertence ao terço inferior do alto rio Paraná. Do lado do Estado do Mato Grosso do Sul, encontra-se a planície de inundação do alto rio Paraná, constituída por intensa rede de canais secundários, o rio Baía e os cursos inferiores de rios marginais e várzeas. Antes do barramento de Porto Primavera, a área era freqüentemente alagada na época chuvosa do ano. As inundações estão dependentes da abertura de comportas de usinas situadas à montante da planície. Atualmente, esta região é uma Área de Proteção Ambiental (APA). As coletas foram realizadas na base do Nupelia e na praia da Ilha da Bandeira, no município de Porto Rico, Estado do Paraná. No total, foram amostrados e analisados 20 exemplares de *A. altiparanae* nesta área de coleta.

### **3.1.3. Reservatório de Barra Bonita**

No reservatório de Barra Bonita foram coletados e analisados sete espécimes de *A. altiparanae*. Barra Bonita é um dos reservatórios mais antigos do rio Tietê, com início de sua construção em meados de 1962. Está situado a 20° 31'Sul e 48° 32' oeste. Na altura do reservatório de Barra Bonita, o rio Tietê faz a divisa entre os municípios Barra Bonita e Igarazu (SP).

#### **3.1.4. Água Limpa**

Foram coletados e analisados 15 espécimes de *A. altiparanae* na represa municipal de Monte Aprazível, Estado de São Paulo, no rio Água Limpa. O município situa-se a latitude 20° 46' 21" Sul e longitude 49° 42' 51" Oeste. O rio Água Limpa é afluente do rio São José dos Dourados, que por sua vez é tributário do rio Paraná no reservatório de Ilha Solteira. Atualmente, o rio São José dos Dourados está ligado ao rio Tietê pelo canal Pereira Barreto.

#### **3.1.5. Rio Manso e Rio Cuiabá**

Cinco exemplares de *A. asuncionensis* foram coletados no rio Manso e no rio Cuiabá, nas proximidades da APM Manso de Furnas Centrais Elétricas S/A. APM Manso está localizada no rio Manso, na chapada dos Guimarães, no Estado de Mato Grosso.

### **3.2. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

Os espécimes coletados foram imediatamente colocados em frascos com álcool comercial. O álcool foi trocado pelo menos duas vezes, em intervalos de 24 horas. Depois de transferidos para o Laboratório de Genética –DBC/Nupelia os frascos contendo os espécimes foram armazenados a -20 °C. Os experimentos para as análises moleculares foram executados no Laboratório de Genética Geral do DBC–UEM e no Laboratório de Genética do Nupelia –UEM.

### **3.3. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL**

Para extração do DNA genômico foram utilizadas amostras de tecido muscular. A extração de DNA foi realizada de acordo com Monesi *et al.* (1998)

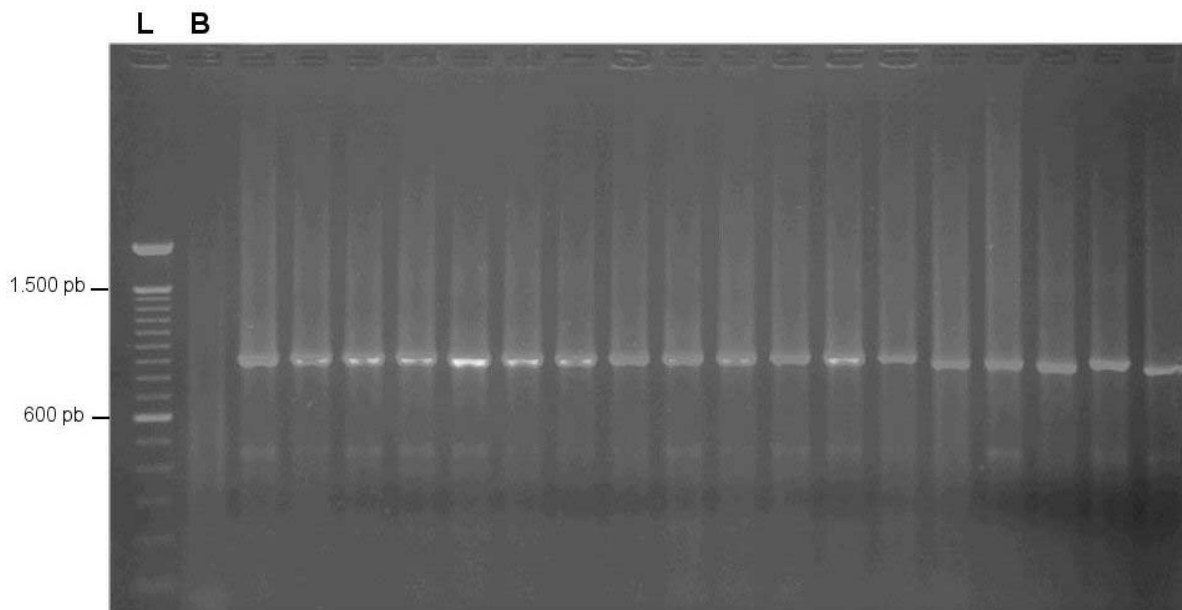
Fragmentos de tecido muscular (aproximadamente 100 mg) foram macerados em nitrogênio líquido em *graal* de porcelana. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e 500 µL de tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL) e o macerado foi incubado em banho-maria com agitação lenta (aprox. 60 rpm) a 37 °C, durante 1 hora. O DNA foi então extraído duas vezes e purificado em um volume equivalente de fenol/clorofórmio (1:1, v:v), lavado com clorofórmio e centrifugado a 12.000 rpm por 12 minutos. A seguir, o DNA foi precipitado com a adição de solução salina (NaCl 5 mM) e etanol absoluto gelado, seguido de uma incubação a -20 °C por 12 a 24 horas. O pellet obtido foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,01 mM EDTA), com RNase (20 µg/mL). A suspensão de DNA foi estocada a -20 °C. Alíquotas dessas amostras foram utilizadas para uma estimativa visual da quantidade de DNA em comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ em gel de agarose (0,8%) e corado com brometo de etídio (20 µg/100 mL).

#### 3.4. PCR E SEQÜENCIAMENTO DE DNA MITOCONDRIAL

Foi feita a amplificação de fragmentos específicos do genoma mitocondrial, via PCR, com amostras de DNA de peixes *Astyanax* de cada população. Estão disponíveis na literatura *primers* baseados em genes conservados de tRNA ou rRNA que podem ser usados para amplificar genes de proteínas ou de região controle (*D-loop*) em espécies distantes. A metodologia de amplificação dos fragmentos de mtDNA foi baseada em Prioli *et al.* (2002).

Parte da região *D-loop* e do *citocromo b* de 44 indivíduos foi amplificada, via PCR. Esses fragmentos de mtDNA, de aproximadamente 760 pb, foram amplificados em duas reações independentes de PCR para depois serem seqüenciados e analisados, como réplicas. Os *primers* utilizados foram o H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M 5'-CAACATGAATTGGAGGTATACCAGT-3' (Prioli *et al.*, 2002). A mistura do PCR consistiu de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U *Taq*-DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Milli-Q para completar o volume para 25 µL. O DNA foi desnaturado por aquecimento da mistura de reação a uma temperatura de 94 °C por 4 minutos e a amplificação ocorreu em 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos, seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Após a amplificação, alíquotas de cada mistura da reação com o fragmento do DNA amplificado foi quantificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (20 µg/100 mL) e comparado com quantidades conhecidas de DNA do marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen) (Figura 2).

O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente como amostra para o seqüenciamento em seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) do Laboratório da Profa. H. Carrer, na ESALQ-USP, e o seqüenciamento teve a colaboração direta da Profa. L. M. Prioli do DBI-UEM. As seqüências foram amplificadas com o kit BigDye™ terminator v. 3.0



**Figura 2.** Foto do gel de quantificação do fragmento de 760 pb do mt DNA abrangendo a extremidade do gene *cyt b*, os genes *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>* e uma seqüência parcial da região *D-loop*. **L:** Ladder 100 pb; **B:** controle negativo.

(Perkin Elmer Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 50 ng de cada amostra de DNA e 20 pmol de cada *primer* foi adicionado na reação de seqüenciamento. Imediatamente após a elevação da temperatura da mistura da reação para 94 °C por 4 minutos, as amplificações do fragmento de *D-loop* mitocondrial foram realizadas em 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto e 30 segundos a 60 °C, seguidos de 5 minutos a 60°C. Os dados do seqüenciamento foram coletados pelo programa de análise do seqüenciamento (Perkin Elmer) e submetidos a um teste de qualidade pelo software Vector NTI Suíte versão 6.0 (Informax, Inc.). A seqüência de nucleotídeos de cada peixe foi confirmada nas duas fitas de DNA das duas amostras de PCR obtidas independentes. Os fragmentos de DNA amplificados de diferentes amostras foram alinhados e regiões com e sem homologia foram avaliadas para a identificação de sítios polimórficos.

Seqüências de DNA de 383 a 418 pb, amplificadas do segmento hipervariável da região controle do DNA mitocondrial (Acesso *GenBank* números

AY395494 a AY395513), foram usadas em análises de relações genéticas. Essa região parcial do *D-loop* foi seqüenciada em quarenta e cinco exemplares de *A. altiparanae* e cinco exemplares de *A. asuncionensis*. Seqüências correspondentes de populações do Keller (Ke), Pirapó (Pi), e Iguaçu (Ig) (Acessos *GenBank* AY125820 a AY125843) foram incluídos nas análises (Prioli *et al.*, 2002).

Sítios de deleção não foram incluídos nas análises, seguindo o consenso de que o significado evolutivo das deleções em seqüências do DNA não é bem conhecido (Nei e Kumar, 2000). Análises genéticas são realizadas com o programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) para obtenção da matriz de distâncias genéticas de Tamura e Nei (1993) com distribuição *gamma*. Os coeficientes *gamma* foram estimados utilizando-se o programa PAUP\* versão 4.0 (Swofford, 2002). Foram incluídos nas análises todos os exemplares da planície de inundação, do reservatório de Itaipu (Guaíra e Entre Rios), do reservatório de Barra Bonita, da bacia São José dos Dourados (Água Limpa) e de Cuiabá/Manso. As seqüências dos rios Keller, Pirapó e Iguaçu, disponíveis no *GenBank*, foram utilizadas sem a repetição de haplótipos. Dendrogramas *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com e sem a população de *A. asuncionensis* de Cuiabá/Manso, foram construídos com base em matriz de distâncias Tamura e Nei. Gráficos de dispersão em coordenadas principais também foram construídos com e sem a população de *A. asuncionensis*. Antes da construção dos gráficos, as matrizes de distâncias de Tamura e Nei foram corrigidas com a correção proposta por Lingoes (Legendre e Anderson, 1999).

#### 4. RESULTADOS

Um fragmento de mtDNA de aproximadamente 760 pb foi amplificado, via PCR, a partir das amostras de DNA total dos 50 exemplares de *Astyanax* das nove populações estudadas. Esse fragmento de mtDNA amplificado contém quatro seqüências com funções distintas. No início do fragmento está uma seqüência parcial (aproximadamente 90 pb) da extremidade 3' do gene mitocondrial *cyt b*, que codifica o *citocromo b*. A seguir, encontram-se 139 pb correspondentes às seqüências nucleotídicas completas dos genes *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>*, que codificam os tRNAs dos aminoácidos treonina e prolina, respectivamente. O restante do fragmento de DNA amplificado e seqüenciado consiste da seqüência hipervariável da região controle da molécula de mtDNA. A seqüência hipervariável corresponde a uma porção relativamente grande da extremidade 5' da fita pesada da região controle do mtDNA. As seqüências nucleotídicas da região controle e *cyt b* foram identificadas por similaridade com acessos disponíveis no *GenBank*, via BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os genes tRNA foram identificados com o programa tRNAScan-SE (Lowe e Eddy, 1997).

Todos os exemplares coletados na planície de inundação do alto rio Paraná, Entre Rios, Guaíra, Barra Bonita e Água Limpa, assim como os indivíduos do Iguaçu, Keller e Pirapó, foram identificados como *A. altiparanae*, com base em características morfológicas tradicionais, de acordo com Garutti e Britski (2000). Os espécimes coletados no rio Manso foram identificados morfológicamente como *A. asuncionensis*, de acordo com Lima *et al.* (2003).









A seqüência hipervariável da região controle do mtDNA analisada consistiu de aproximadamente 382 pb em 19 indivíduos identificados, como sendo da espécie *A. altiparanae* e os cinco indivíduos de *A. asuncionensis*. Os outros 26 espécimes analisados foram identificados como *A. altiparanae* e possuíam cerca de 417 pb na seqüência *D-loop*. Foram identificados 42 haplótipos da região controle entre os 45 indivíduos *A. altiparanae* estudados (Figura 4). Os haplótipos estão claramente distribuídos em dois grupos distintos como está ilustrado nas Figuras 6 e 7. Um dos grupos está presente em todas as populações analisadas. O outro grupo de haplótipos foi registrado apenas na planície de inundação do alto rio Paraná. Na planície, os dois grupos de haplótipos ocorrem em simpatria. O grupo de haplótipos menos freqüente na planície de inundação, compreende quatro espécimes (Alt-PR-4, Alt-PR-9, Alt-PR-11 e Alt-PR-52) e possui uma alta similaridade com os haplótipos das populações dos rios Keller, Pirapó, Iguaçu, Entre Rios, Guaíra, Barra Bonita e Água Limpa.

Como mostra a Figura 4, em todos os haplótipos estudados, as substituições de nucleotídeos consistiram principalmente em transições. O grupo de haplótipos exclusivo e predominante na planície de inundação é geneticamente diferenciado por um significativo polimorfismo na região controle. A diferenciação entre os dois grupos de seqüências foi caracterizada por 24 sítios polimórficos de substituição nucleotídica e uma deleção simples. Além disso, uma marcante alteração encontrada foi a deleção dos nucleotídeos 225 até 257. Portanto, além dos sítios nucleotídicos únicos, os dois grupos de haplótipos diferem entre si por uma deleção de um trecho de 32 pb no interior da região *D-loop*.



Polimorfismo na seqüência nucleotídica do gene *tRNA<sup>Thr</sup>* não foi expressivo na espécie *A. altiparanae*. Apenas uma substituição simples e quatro deleções simples foram encontradas, mas não associadas aos grupos de haplótipos (Figura 5). Nessa espécie somente duas substituições simples foram detectadas no gene *tRNA<sup>Pro</sup>* (Figura 5).

Como mostrado na Figura 6, o algoritmo *neighbor-joining* aplicado às distâncias genéticas de Tamura e Nei (1993), com distribuição *gamma*, separou os indivíduos de *A. altiparanae* em dois grupos, com um valor *bootstrap* de 100%. Em um dos grupos encontram-se os 26 indivíduos analisados que não apresentam a deleção de 32 pb na seqüência *D-loop*. Esse grupo é composto por uma mistura de quatro haplótipos da planície de inundação do alto rio Paraná e todos os haplótipos do Iguaçu, Keller, Pirapó, Entre Rios, Guaíra, Barra Bonita e Água Limpa. O outro grupo de haplótipos incluiu somente os 19 indivíduos da planície de inundação do alto rio Paraná que apresentam a deleção de 32 pb. Deve ser ressaltado que para a construção da árvore não foram considerados os sítios com deleção, que exigem interpretações genético-evolutivas muito complexas (Nei e Kumar, 2000). Portanto, a separação dos dois grupos de haplótipos foi baseada nos sítios com substituições de bases, como mencionado anteriormente. Braços curtos e baixos valores de *bootstrap* revelam alta similaridade entre os haplótipos dentro de cada grupo de haplótipos.

O gráfico de dispersão em coordenadas principais (Figura 7), baseado na matriz de distâncias de Tamura e Nei (1993), com correção de Lingoes, também foi eficiente para separar os indivíduos em dois grupos. Os dois grupos são compostos exatamente pelos mesmos indivíduos que compõem os dois grupos de haplótipos identificados na análise de agrupamento.



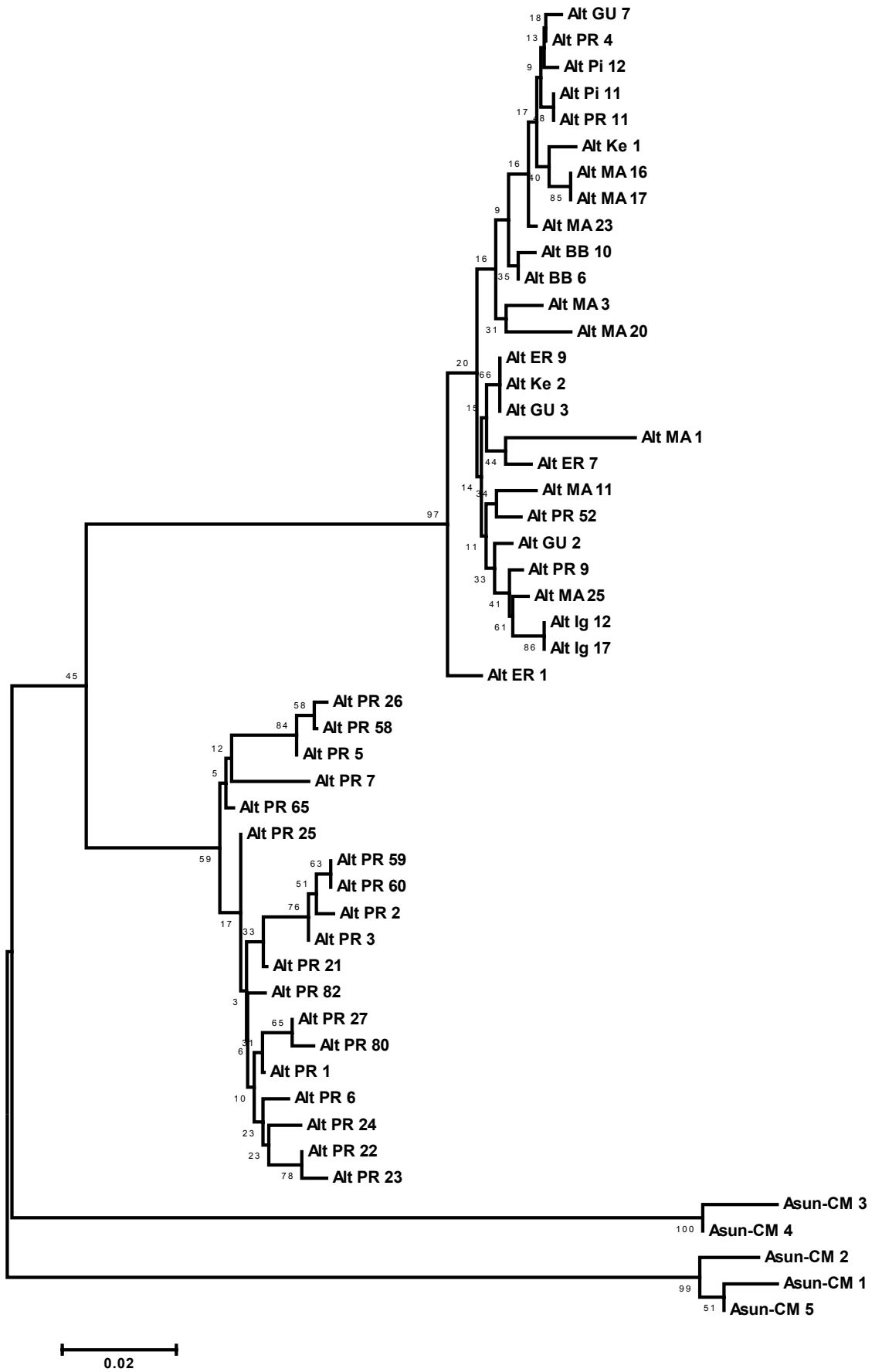


A análise das seqüências *D-loop* dos indivíduos da espécie *A. asuncionensis* mostrou cinco haplótipos, que formam dois grupos. Dentro de cada grupo há poucos sítios polimórficos, mas foram encontrados 53 sítios polimórficos entre os dois grupos (Figura 4). A separação em dois grupos de haplótipos na amostra de *A. asuncionensis* é revelada pelo dendrograma *neighbor-joining* (Figura 8) e pelo gráfico de dispersão em coordenadas principais (Figura 9).

A seqüência nucleotídica do gene *tRNA<sup>Thr</sup>* de *A. asuncionensis* difere do gene *tRNA<sup>Thr</sup>* de *A. altiparanae* por apenas uma deleção. Além disso, *A. altiparanae* e *A. asuncionensis* não diferem quanto às seqüências do gene *tRNA<sup>Pro</sup>* (Figura 5).

*A. asuncionensis* compartilha a deleção de 32 pb na região controle encontrada na população da planície de inundação do alto rio Paraná. Por outro lado, os haplótipos de *A. asuncionensis* diferem em cerca de 40 sítios nucleotídeos em relação aos haplótipos com e sem deleção encontrados na planície de inundação do alto rio Paraná.







## 5. DISCUSSÃO

Sítios de polimorfismo de nucleotídeos estão presentes na seqüência hipervariável da região controle, em todas as populações de *A. altiparanae* analisadas. As mutações acumuladas na seqüência hipervariável da região controle proporcionam diferenças populacionais adequadas para serem utilizadas como marcadores moleculares em estudos intra e interespecíficos, inclusive em peixes (Meyer, 1994; Faber e Stepien, 1977; Sivasundar *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002). As distâncias genéticas inferidas do alto polimorfismo da região controle do mtDNA de *A. altiparanae* da planície de inundação do alto rio Paraná revelaram dois grupos simpátricos, altamente diversificados. O grupo com a deleção de 32 pb não foi encontrado em nenhum outro lugar além da planície de inundação. Baseando-se exclusivamente nas análises morfométricas, não foram detectadas diferenças entre esses dois grupos de haplótipos. Portanto, o polimorfismo acentuado observado na seqüência nucleotídica da região controle do mtDNA não se mostrou correlacionado com os caracteres morfológicos analisados. Esta diversidade genética interpopulacional representada pelo alto polimorfismo intraespecífico pode ter sido originada de duas populações ancestrais ou ela indica a existência de uma espécie ainda não diagnosticada na planície de inundação do alto rio Paraná.

Recentemente, *A. altiparanae* tem sido extensivamente estudado dentro da sistemática tradicional e citogenética. Polimorfismos citogenéticos têm sido observados entre amostras de populações de *A. altiparanae* de muitos rios da província do Alto Paraná (Daniel-Silva e Almeida Toledo, 2001; Pacheco *et al.*,

2001; Fernandes, 2002). No entanto, diversidade citogenética intrapopulacional não havia sido detectada em *A. altiparanae* dentro da planície de inundação do alto rio Paraná. Com base em estudos de polimorfismos cromossômicos tem sido sugerido que *A. altiparanae* abrange um complexo de espécies, como já foi indicado em outros grupos de *Astyanax* (Fernandes, 2002).

O DNA mitocondrial é um marcador molecular particularmente atraente para estudos de biodiversidade e genética populacional, principalmente por ser de fácil obtenção, apresentar alta taxa de mutação e herança materna não recombinacional. A região controle mostrou-se adequada como marcador molecular para estudos de variação genética intraespecíficos e parentescos genéticos entre espécies relacionadas de peixes, Ciclídeo (Meyer, 1994), Percidae (Faber e Stepien, 1977), Curimatidae (Oliveira *et al.*, 2002), Characidae (Prioli *et al.*, 2002). Polimorfismos de nucleotídeos na região controle são altos entre os dois grupos de haplótipos de *A. altiparanae* e demonstraram uma diversidade genética mitocondrial que não pode ser reconhecida com base nos traços morfológicos. Os resultados obtidos aqui sugerem que o grupo de haplótipos com a deleção de 32 pb não está disseminado para fora da planície de inundação. De fato, não é uma variante muito comum, tanto que no reservatório de Itaipu (Entre Rios e Guaíra), região próxima da planície, nenhum exemplar desse haplótipo foi encontrado ou, ainda, como mostra o estudo prévio (Prioli *et al.*, 2002), na área dos rios Keller, Pirapó e Iguaçu tampouco foi encontrado.

Considerando a hipótese de polimorfismo intraespecífico do mtDNA, o alto nível observado na diversidade genética pode ter sido originado de dois ancestrais diferentes na população *A. altiparanae*. O alto nível de substituições nucleotídicas que separam os dois grupos de haplótipos sugerem que as duas

populações *A. altiparanae* teriam sido isoladas no passado, o que pode ter originado a diferenciação observada no mtDNA. Embora eles sejam geneticamente diferenciados, deve ser também considerada a hipótese de ancestrais diferentes capazes de hibridização na natureza, produzindo descendentes férteis. Por isso, diferente da recombinação do DNA nuclear que homogeneiza a população, o DNA mitocondrial permanece diferenciado na população por causa da herança materna. Dentro desta hipótese é razoável supor que o haplótipo prevalente é herdado das mães que deixam descendentes mais freqüentemente.

A segunda hipótese para explicar o polimorfismo observado na seqüência da região controle do mtDNA de *A. altiparanae*, que formam, consistentemente, dois grupos de haplótipos, seria a existência de uma espécie ainda não diagnosticada na planície de inundação do alto rio Paraná. Essa espécie hipotética pode ser relacionada com *A. altiparanae*, mas não é reconhecida com base na avaliação de marcadores morfológicos. O grupo de haplótipos exclusivo da planície de inundação pode representar esta espécie desconhecida. Esta poderia ser uma espécie recentemente introduzida na planície de inundação e ainda não estar dispersa em tributários próximos ou distantes do rio Paraná. Poderia ser, também, uma espécie de hábito mais sedentário do que as espécies conhecidas de *Astyanax*.

Mais ainda, a possibilidade da ocorrência de cruzamentos, gerando híbridos férteis, entre a espécie hipotética de *Astyanax* introduzida e a espécie *A. altiparanae* da planície de inundação tem que ser considerada. A hibridização natural introgressiva tem um importante significado evolutivo para a diversidade genética e a especiação. Peixes, principalmente teleósteos de água doce,

mostram uma propensão para hibridização (Hubbs, 1955; Smith, 1992). Embora não freqüente, a transferência do mtDNA tem sido reportada entre espécies de peixes, incluindo largas extensões do genoma mitocondrial ou, como sugerido recentemente, por seqüências parciais do citocromo b e região controle de *Oreochromis aureus* e *O. niloticus* (Rognon e Guyomard, 2003). Tem sido inferido que os mecanismos que eliminam o mtDNA masculino podem falhar e levar a uma condição de heteroplasma transitória (Rand, 2001). Se a hibridização entre *A. altiparanae* e uma espécie desconhecida ocorrer freqüentemente na planície de inundação, não pode ser reconhecida com os dados do presente estudo. Provavelmente, o baixo número de cópias do DNA paterno não seria detectado em seqüenciamento direto de produtos de reação de PCR, pois o resultado do seqüenciamento reflete a amplificação das moléculas de DNA mais freqüentes.

Análises moleculares adicionais para investigar a hipótese da espécie introduzida de *Astyanax* na planície de inundação requerem o uso de marcadores nucleares eficientes em adição aos dados de mtDNA, para diminuir os riscos de interpretações errôneas quando apenas uma classe de marcador é usada (Smith, 1992; Rognon e Guyomard, 2003). Eventualmente, se a hibridização interespecífica for demonstrada, análises das seqüências clonadas de PCR amplificados do DNA mitocondrial podem ser interessantes para um estudo da possível existência de heteroplasma em híbridos interespecíficos.

A introdução de espécies de peixes do médio rio Paraná, do trecho abaixo dos saltos de Sete Quedas, na planície de inundação do alto rio Paraná tem sido extensivamente reportadas (Agostinho *et al.*, 1993; Agostinho e Julio Jr, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). Portanto, se o grupo de haplótipos prevalente for de uma espécie introduzida na planície de inundação, é mais provável que a introdução

tenha ocorrido durante o alagamento dos saltos de Sete Quedas, depois da construção do reservatório de Itaipu há pouco mais de 20 anos. Também pode ser hipotetizado uma introdução a partir de lagoas isoladas, contendo populações de *Astyanax* geneticamente isoladas. Desde milhares de anos muitas lagoas permanentes, que podem chegar a ter cerca de três quilômetros de diâmetro, estão isoladas do rio Paraná e ainda existem nas proximidades da planície de inundação (Souza Filho e Stevaux, 1997). O grupo de haplótipos predominante, identificado neste trabalho, poderia ter sido introduzido na planície de inundação se um grande alagamento ocorreu em um passado recente, conectando temporariamente de um ou mais dessas pequenas lagoas com a da planície de inundação.

A introdução de espécies exóticas pode causar um alto impacto nas espécies locais, promovendo diversas conseqüências negativas para biodiversidade (Agostinho e Júlio Jr, 1999; Sakai *et al.*, 2001). Comunidades podem ser mais susceptíveis quando existe a possibilidade de ocorrer hibridação entre espécies introduzidas e espécies nativas. Marcadores RAPD revelaram que *Steindachnerina brevipinna* foi introduzida na planície de inundação e, mais ainda, esta espécie se cruza com a espécie nativa *S. insculpta*, gerando híbridos naturais (Oliveira *et al.*, 2002). De acordo com Garutti e Britski (2000), *A. altiparanae* não era encontrado no médio rio Paraná, mas ocorriam outras espécies similares, tais como o *A. abramis* (Jenyns, 1842), *A. asuncionensis* Géry, 1972, e *A. paraguayensis* (Fowler, 1918) (Garutti, 1995). Destas três espécies, *A. asuncionensis* é a que se assemelha com *A. altiparanae*. Comparações preliminares morfométricas entre *A. asuncionensis* e os exemplares com e sem deleção da planície de inundação, baseadas em características

tradicionalis morfológicas, não apresentaram resultados conclusivos. Estudos morfológicos e moleculares adicionais, incluindo a espécie conhecida como *A. altiparanae*, são necessários para uma melhor caracterização e entendimento da diversidade genética mitocondrial revelada neste trabalho. Hibridização interespecífica, produzindo híbridos férteis naturais, podem causar uma homogeneização genética e um risco de extinção local da população de *A. altiparanae* na planície de inundação e nos muitos tributários do rio Paraná.

A diversidade genética mitocondrial de *A. altiparanae* identificada neste estudo levantou questões adicionais sobre a diversidade genética dentro desta espécie, bem como quanto à introdução de espécies exóticas na planície de inundação do alto rio Paraná. A alta diversidade do grupo de haplótipos pode ser originada de duas populações ancestrais diferentes de *A. altiparanae* ou indica a existência de uma espécie desconhecida no alto rio Paraná.

*A. altiparanae* e *A. asuncionensis* são muito semelhantes quanto às seqüências dos *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>*. Esta alta similaridade de seqüências de genes que codificam tRNAs mitocondriais, que são seqüências evolutivamente mais conservadas que a região controle, demonstra a proximidade genética das duas espécies. Essa similaridade genética encontra correspondência na morfologia, pois existem dificuldades para discriminação das duas espécies com base em apenas caracteres morfológicos. Outras espécies de *Astyanax* do médio rio Paraná e da sub-bacia do rio Paraguai diferem na morfologia em relação a *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*. Seqüências da região controle de *A. abramis* não publicadas, realizadas no Laboratório, mostraram-se tão divergentes que a espécie foi descartada como relacionada com grupo de haplótipos com e sem a deleção. Deve ser lembrado que até recentemente na sub-bacia do rio Paraguai



esses indivíduos eram identificados como *A. bimaculatus* (Britski *et al.*, 1999). Conforme Lima *et al.* (2003), doravante na sub-bacia do rio Paraguai, o grupo anteriormente reconhecido como *A. bimaculatus* deve ser identificado como *A. asuncionensis*. Considerando-se que *A. altiparanae* também era identificado como *A. bimaculatus* (Garutti e Britski, 2000), pode-se prever dificuldades acentuadas na discriminação das duas espécies, com sobreposição das características utilizadas na identificação.

Assim, o grupo de haplótipos com deleção deve ser originário de *A. altiparanae* ou *A. asuncionensis*. Evidentemente, o grupo de haplótipos pode ser oriundo de uma espécie ainda não identificada, mas não se têm indicativos nesse sentido. Existe a possibilidade de *A. asuncionensis* ter se estabelecido na planície do alto rio Paraná e, por enquanto, não ter sido identificado com base em caracteres morfológicos. De acordo com essa interpretação, o grupo de haplótipos com deleção encontrado na planície representaria uma população de *A. asuncionensis*.

Os dois grupos de haplótipos de *A. asuncionensis* diferem, cada um, dos haplótipos com deleção da planície em cerca de 40 sítios nucleotídicos. Considerando-se que a seqüência da região controle do mtDNA é muito variável, esta divergência estaria dentro da faixa de polimorfismo intraespecífico que se poderia encontrar. Note-se que entre os haplótipos de *A. asuncionensis* são encontradas diferenças em 53 sítios nucleotídicos. Esses resultados sugerem que na sub-bacia do rio Paraguai e no médio rio Paraná a espécie *A. asuncionensis* poderia estar representada por grupos de haplótipos bastante diferenciados. Não se pode descartar a hipótese de que os haplótipos atualmente existentes na planície não teriam sido amostrados nas coletas para as análises moleculares no

presente estudo. Portanto, não se pode excluir a hipótese de que *A. asuncionensis* se estabeleceu no alto rio Paraná depois do alagamento do reservatório de Itaipu.

Os dados atuais, obtidos com marcadores mitocondriais, não permitem descartar a hipótese de ocorrência de cruzamentos entre *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, gerando híbridos férteis. A hibridação natural introgressiva resultaria em tipos intermediários que tornariam ainda mais complexa a discriminação das duas espécies. Tendo em vista essas dificuldades, a possibilidade de hibridação natural deverá ser investigada com marcadores moleculares nucleares.

Estudos adicionais com marcadores moleculares e morfológicos devem ser conduzidos para esclarecer as questões aqui levantadas. O ponto crítico será determinar se o grupo de haplótipos com a deleção de 32 pb surgiu como evento independente dentro da espécie *A. altiparanae* ou se está relacionado com a espécie *A. asuncionensis*. Coletas em diversos pontos da província Parano-Platense e da sub-bacia do rio Paraguai poderiam oferecer indicativos para a hipótese do estabelecimento de *A. asuncionensis* no alto rio Paraná. Por outro lado, indicativos para a origem dentro de *A. altiparanae* poderiam ser obtidos com coletas em diversos pontos da província do alto rio Paraná, principalmente em pontos inacessíveis a um possível invasor, isolados por barragem sem eclusas ou escadas de peixes, por exemplo.

Finalmente, restará a questão da alta frequência e a aparente exclusividade dos haplótipos com a deleção 32 pb na planície de inundação do alto rio Paraná. Aparentemente, a resposta menos complexa estaria relacionada

com uma espécie invasora que ainda não teve tempo para se dispersar no alto rio Paraná e seus tributários.

## 6. CONCLUSÕES

1. O polimorfismo encontrado na região controle do mtDNA dos espécimes de peixes identificados como *Astyanax altiparanae* e *Astyanax asuncionensis* foi adequado para estudar distâncias genéticas dentro e entre as populações amostradas.
2. O baixo polimorfismo encontrado nas seqüências nucleotídicas mais conservadas do genoma mitocondrial aqui analisadas (*cyt b*, *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>*) foi insuficiente para estudos de distância genética e revela, como esperado, que as duas espécies são altamente aparentadas.
3. As distâncias genéticas inferidas do alto polimorfismo no segmento hipervariável da região controle do mtDNA revelaram dois grupos de haplótipos distintos e altamente diversificados, que não eram até então conhecidos, existindo em simpatria na planície de inundação do alto rio Paraná.
4. Não há correlação entre a morfometria das populações identificadas como *A. altiparanae* e o polimorfismo acentuado entre os dois grupos de haplótipos revelados no presente trabalho. A diversidade genética mitocondrial sugere que o polimorfismo pode ter sido originado de duas populações ancestrais ou pela presença de uma espécie ainda não diagnosticada na planície de inundação do alto rio Paraná.

5. Uma hipótese para explicar a origem do haplótipo predominante no rio Paraná seria a introdução, na planície, de populações de *Astyanax* geneticamente diferenciadas por isolamento geográfico, por transbordamento ou inundação de lagoas isoladas há milhares de anos na planície.
6. A deleção de 32 sítios nucleotídicos, que é característica do haplótipo predominante na planície, está também presente nos dois haplótipos de *A. asuncionensis*.
7. *A. asuncionensis* está representado por grupos de haplótipos bastante diferenciados, mantendo em aberto a hipótese de que o grupo de haplótipos com deleção da planície é uma variante de *A. asuncionensis* que se estabeleceu no alto rio Paraná depois do alagamento do reservatório de Itaipu.
8. Considerando-se que na grande maioria das espécies o mtDNA é exclusivamente de transmissão materna, marcadores moleculares nucleares se fazem necessários para, em estudos futuros, verificar a hipótese de cruzamentos entre *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, gerando híbridos férteis. Hibridação natural introgressiva resultaria em tipos intermediários que tornariam ainda mais complexa a discriminação das duas espécies e poderia explicar a impossibilidade de se diferenciar os exemplares da planície com base nos marcadores morfométricos disponíveis.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNÈSE, J.F.; ADÉPO-GOURÈNE, B.; ABBAN, E.K.; FERMON, Y. Genetic differentiations among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **Heredity**, v. 79, p. 88-96, 1997.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR, H.F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNEL, R.H. (Ed.). **Ecologia de Comunidades Tropicais**. EDUSP. São Paulo. 1999. p. 375-399.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR, H.F.; BORGHETTI, J.R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. **Revista INIMAR**. v. 14 (Suplemento), p. 89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR, H.F.; GOMES, L.C. Allochthonous species in the upper Parana basin: status and patterns. 2003, Manaus. **Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists**.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR, H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Ed.). **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. Universidade Estadual de Maringá: Maringá. 1997. p.179-208.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR, H.F.; PETRERE, M. Itaipu Reservoir: Impacts of the impoundment on fish fauna and fisheries. In: COWX, I. (Ed.). **Rehabilitation of Freshwater Fisheries**. Fishing News Books: Oxford Press, New York. 1993. p. 171-184.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annu Rev Ecol Syst**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BONETTO, A.A. Fish of the Paraná system. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. (Ed.) **The Ecology of River Systems**. Dr W Junk Publishers: Dordrecht: Netherlands. 1986. p. 573-588.
- BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.

BRITSKI, H.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. 3 ed. Brasília; CODEVASF, 1988. 115p.

BRITSKI, H.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. 1 ed. Brasília; Embrapa, 1999. 184p.

CHINNERY, P.F.; THORBURN, D.R.; SAMUELS, D.C.; WHITE, S.L; DAHL, H.M.; *et al.* The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? **TIG**, v.16, n. 11, p. 500-505, 2000.

DANIEL-SILVA, M.F.Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. Dissertação (Mestrado), USP, São Paulo, SP.

DANIEL-SILVA, M.F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, p. 209-215, 2001.

FABER, J.E.; STEPIEN, C.A. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of Percidae. In: KOCHER T.D.; STEPIEN, C.A. (Ed.). **Molecular Systematics of Fishes**. Acad. Press: NY, 1977. p. 129-143.

FERNANDES, C.A. Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes). **2002. 49f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) –Departamento de Biologia Celular e Genética, UEM, Maringá, PR.**

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysian fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

GARESSE, R.; CARRODEGUAS, J.A.; SANTIAGO, J.; PÉREZ, M.L.; MARCO, R.; VALLEJO, C.G. Artemia mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. **Comp Biochem Physiol**, v. 117B, n. 3, p. 357- 366, 1997.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. Tese (Livre-Docência), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, 1995.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da planície de inundação do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na planície de inundação. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 451-453, 2002.

GRAVES, J.E. Molecular insights into the populations structures of cosmopolitan marina fishes. **J Hered**, v. 89, p. 427-437, 1998.

HUBBS, C. L. Hybridization between fish species in nature. **Systematic Zoology**, v. 4, p. 1-20. 1955.

JULIO JR, H.F.; AGOSTINHO, A.A. Introduced species into the Upper Paraná River floodplain by elimination of a geographical barrier and stocking programs. 2003, Manaus. **Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists**.

KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**. **Bioinformatics**. Arizona State University, Tempe, 2001.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M.J. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, p. 1-24, 1999.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P. da; *et al.* Genera Incertae Sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS: Porto Alegre. 2003. p. 106-169.

LOWE, T.M.; EDDY, S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 995-964, 1997.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genet Mol Biol**, v. 23, n.2, p. 365-369, 2000.

MATOSO, D.A. **Análise da diversidade genética e estrutura populacional em *Astyanax* sp do Parque Estadual de Vila Velha, pequenos afluentes e calha do alto rio Tibagi**. 2002. 60f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Genética e Evolução, UFSC, São Carlos, SP.

MATOSO, D.A., ARTONI, R.F.; GALETTI JR, P.G. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. **Hydrobiologia**, v. 527, n. 1, p. 223-225, 2004.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A.R. (Ed.). **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. London: Chapman Hall : 1994, p. 219-249.

MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P. *et al.* Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v. 347, p. 550-553, 1990.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M., PAÇÓ –LARSON, M, L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 10, p. 559-569, 1998.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, p. 235-244, 1983.



MOYSÉS, C.B.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 401-407, 2002.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York, Oxford University Press, 2000.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 3 ed. John Wiley, Sons Inc., 1994. 600p.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAVANELLI, C.S.; JULIO JR, H.F.; PANARARI, R.S. Diversity and distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. **Genética**. 2002. (in press)

PACHECO, R.B., GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytotypes and Multiple NORs in *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v. 5, p.109-114, 2001.

PRIOLI, S.M.A.P. **Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero *Astyanax* do rio Iguaçu, analisadas por marcadores de DNA mitocondrial e RAPD**. 2001. 47f. Tese (Doutorado Biologia/ Ecologia) – NUPELIA, UEM, Maringá, PR

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO Jr, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

RAISSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-base DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 12, p.113-118, 1991.

RAND, D.M. The units of selection on mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 415-448, 2001.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. 1 ed. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003. 742p.

ROGNON, X.; GUYOMARD, R. Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 435-445, 2003.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Elsevier**, v. 18, n. 8, p. 411-417, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAI, A.K., ALLENDORF, F.W., HOLT, J.S., LODGE, D.M., MOLOFSKY, J., KIMBERLY A.W., *et al.* The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 305-332, 2001.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes. (*Prochilodus*, Characiformes) in major South American rivers. **Mol Ecol**, v. 10, p. 407-417, 2001.

SMITH, G.R. Introgression in fishes: Significance for paleontology cladistics and evolutionary rates. **Systematic Biology**, v. 41, p. 41-57, 1992.

SOUZA FILHO, E.D.; STEVAUX, J.C. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Corutuba, Ivinhema. In: VAZZOLER, A.E.A.M., AGOSTINHO, A.A. ; HAHN, N.S. **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos Físicos e Socioeconômicos**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1997. p. 3-46

STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. Genetics divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 699-710, 2003.

**SWOFFORD, D.L.** PAUP\*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (\*and other methods), **vers 4. Software, Sinauer Associates, Sunderland, 2002.**

TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol**, v. 10, p.512-526, 1993.

WEITZMAN, S.H.; FINK, W.L. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of new world characiforms. **Bull Mus Com Zool Harv**, v. 150, n. 6, p. 339-395, 1983.

WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei, Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.N.; LUCENA, C.A. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 161-170.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In: WOLSTENHOLME, D.R.; JEON, K.W. (Ed.). **International review of Cytology: A survey of Cell Biology- Mitochondrial Genomes**. v. 141. New York: Academic Press, 1992. p. 173-216.

ZANATA, A.M. **Estudo filogenético e revisão taxonômica das espécies de Tetragonopterinae com espinho pélvico (Characidae, Characiformes)**. 1995. Dissertação (Mestrado), USP, São Paulo, SP.

# 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](#)