



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAUL HENRIQUE CARDOSO NASCIMENTO

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DO “COMPLEXO *Astyanax
scabripinnis*” (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) NA BACIA
DO RIO TIBAGI E BACIAS ADJACENTES, PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2016

RAUL HENRIQUE CARDOSO NASCIMENTO

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DO “COMPLEXO *Astyanax scabripinnis*” (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) NA BACIA DO RIO TIBAGI E BACIAS ADJACENTES, PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta.
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Camargo Jerep.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N244d Nascimento, Raul Henrique Cardoso.
Diversidade de espécies do "c omplexo A styanax sc abripinnis" (Characiformes :
Characidae) na bacia do rio Tibagi e bacias adjacentes, Paraná, Brasil / Raul
Henrique Cardoso Nascimento. - Londrina, 2016.
64 f.: il.

Orientador: Oscar Akio Shibatta.

Coorientador: Fernando Camargo Jerep.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Astyanax (Peixe) - Teses. 2. Peixe - Identificação - Teses. 3. Ictiologia - Tibagi,
Rio, Bacia (PR) - Teses. I. Shibatta, Oscar Akio. II. Jerep, Fernando Camargo. III.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 597.554.1



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Discente: Raul Henrique Cardoso Nascimento

Título: "Diversidade de espécies do "Complexo *Astyanax scabripinnis*"
(Characiformes: Characidae) na bacia do rio Tibagi e bacias
adjacentes, Paraná, Brasil"

Data da Defesa: 05 de abril de 2016 – 14:00 horas. na sala CCB S/10, desta
Universidade.

Banca Examinadora

Parecer

Presidente:

Dr. Oscar Akio Shibatta

Aprovado

Titulares:

Dr. José Luis Oliven Birindelli

APROVADO

Dr. Bruno Ambrozio Galindo

APROVADO

Parecer Final

Aprovado

Dr. Oscar Akio Shibatta

Dr. José Luis Oliven Birindelli

Dr. Bruno Ambrozio Galindo

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais por todo carinho, amor e apoio. Minha maior herança é o que me ensinaram a ser!

Dedico também á todos as pessoas que me ajudaram ao longo dessa jornada.

“Este é o exemplo da vida,

Para quem não quer

compreender:

Nós devemos ser o que somos,

Ter aquilo que bem merecer”

Milionário & José Rico

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. José Luís Oliván Birindelli, Dr. Bruno Ambrozio Galindo e Dr. Oscar Akio Shibatta pela solicitude e prontidão em aceitar o convite para participar da banca examinadora avaliando e contribuindo para a melhoria do presente trabalho. Também aos professores Dr. Roberto Ferreira Artoni e Dr. Marcos Robalinho Lima por aceitarem fazer parte dessa banca.

À Professora Dra. Lenice Souza Shibatta e ao Professor Dr. José Luís Oliván Birindelli por prontamente aceitarem participar da banca de qualificação, contribuindo grandemente para a melhoria do trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela estrutura física e humana fornecidas ao longo destes dois anos.

À CAPES pela bolsa e pela verba de apoio concedidas, sem as quais não seria possível sua realização.

Ao meu estimado orientador Dr. Oscar Akio Shibatta, que me proporcionou a oportunidade de realizar esse trabalho, e de aprender muito com o convívio do dia-a-dia. Profissionalmente, foi um verdadeiro presente trabalhar ao seu lado professor, com um conhecimento inestimável, é com toda certeza, um dos maiores ictiólogos da história, com uma carreira brilhante e exemplar. Além do lado profissional, é exemplo de qualidades que um ser humano deve ter, das quais destaco seu caráter e justiça. Sinto-me honrado em ter sido seu orientado, muito Obrigado “Professor Oscar”!

Ao meu querido coorientador Dr. Fernando Camargo Jerep, que antes mesmo de conhecer, sempre admirei pelo seu trabalho com peixes do grupo *Hypostomus*. Admiração que se multiplicou quando o conheci pessoalmente, sua dedicação e empenho à ictiologia são exemplares. Assim como o Professor Oscar, possui um caráter inquestionável, e sua humildade e bom coração são reconhecidos por todos, e para mim são inspiradores e admiráveis. Muito obrigado por aceitar participar dessa empreitada, muito obrigado “Jerepinus”!

À professora Dra. Silvia Helena Sofia, pela parceria feita nesse trabalho, que teve partes realizadas em seu laboratório (LAGEA) com total apoio. Além disso, “Sil” tornou-se também uma grande colaboradora pessoal e amiga, compartilhando além de conhecimentos sobre biologia, valiosos ensinamentos em todos os sentidos da vida.

À querida Dra. Lenice Souza Shibatta, pessoa essencial para a realização desse trabalho e participante de diversas atividades acadêmicas realizadas durante o mestrado. Meus agradecimentos pessoais a você “Lenita”, são imensuráveis, você me acolheu logo que cheguei aqui, com essa personalidade especial que conquista o carinho de todos que a conhecem, saiba que é uma referência para mim, muito obrigado!

À professora Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez pela prontidão em sempre me ajudar, e é claro, pela amizade e carinho de sempre, muito obrigado!

Ao professor Dr. José Luís Oliván Birindelli, grande pesquisador que compartilha conosco no dia-adia seus inúmeros conhecimentos ictiológicos. A você “Zé” meu muito obrigado, sua empolgação e amor ao trabalho são invejáveis, com certeza, levarei isso para minha vida, muito obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina por contribuírem muito com minha formação.

Aos professores do curso de biologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná, que me ensinaram com muito carinho e dedicação. Em especial à Bruno, Sandremir, Viviane, Lindalva e Augusto, com os quais ainda tenho contato e aprendo muito.

À toda a minha família, em especial aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, e além disso me ajudaram e correr atrás dos meus sonhos, auxiliando até mesmo além de suas possibilidades. Obrigado por me ensinarem os verdadeiros valores da vida, por me amarem incondicionalmente e darem os maiores exemplos que eu preciso para enfrentar a vida, e aos meus irmãos por me apoiarem, demonstrarem carinho e apreço. Amo vocês!

À minha melhor amiga, companheira e namorada Amanda, obrigado por me aceitar como eu sou. Com você passei todo o período de realização desse trabalho e você sabe como foi difícil chegar até aqui, sinta-se também responsável por esse momento. Lembre-se sempre, assim como sonho por nós, as conquistas que vierem serão também nossas, te amo muito!

À equipe do Museu de Zoologia da Uel, pelo auxílio na execução das coletas e do material biológico assim como pelo companheirismo.

Aos amigos do MZUEL, Edson, Aparecido, Lenice, Thaís, Ana Cecília, Lucas, Alex, Fernando, Fernanda, Nick, Tales, Izabela, Rafael, Julia, Juliana, obrigado pela convivência amigos.

À equipe do Laboratório de Genética e Ecologia Animal, pelo auxílio nos procedimentos e análises moleculares, e também pelo companheirismo.

Aos amigos do LAGEA, Wilson, Dhiego, Douglas, Lenice, Same, Caroline, Camila, Débora, Thiago, Anaih, obrigado pelo companheirismo amigos. Ao amigo e professor, Dr. Bruno Ambrozio Galindo, o qual considero como membro de minha família, e é o grande responsável pela minha iniciação acadêmica, me ensinando muito sobre Genética, mas principalmente o amor à biologia e aos estudos de peixes.

Ao amigo Wilson Frantine, à quem muito estimo e agradeço de forma mais que especial, pelo exemplo de profissionalismo e competência, pelo auxílio e companheirismo diários de longa data, e pelas consultorias sobre genética, biologia de peixes e design gráfico, que com certeza possibilitaram a realização desse trabalho. Além disso, “Will” tornou-se mais que um amigo, um irmão que a vida me deu, ao qual sou honrado em conhecer e poder conviver diariamente, o meu muito obrigado meu irmão!

Ao amigo Dhiego Gomes, à quem tenho um carinho imenso e agradeço de forma especial, pelo exemplo de humildade, profissionalismo, competência e de vida. Muito obrigado “Digo” pelo companheirismo de sempre, e pelas conversas sobre genética, evolução e estudos de peixes, que me deram uma bagagem enorme neste e em outros trabalhos, o meu obrigado irmão!

Ao amigo Carlos Eduardo, à quem tenho muito estimo e agradeço de forma bastante especial, pelo exemplo de competência, dedicação e por possuir um coração gigante. Muito obrigado “Carlão”, pelo companheirismo desde a nossa graduação, pelas conversas e auxílios sobre biologia, sobre os peixes que com certeza contribuíram neste e em outros trabalhos, o meu obrigado irmão!

À amiga Ana Cecília, à quem agradeço de forma especial, pelos auxílios com material biológico e na realização desse trabalho. Muito obrigado “Anita”, por se tornar uma grande amiga ao longo dessa jornada.

Aos amigos, Gazal, Gean, Xande, Milton, Renata, Mayara, Camila, Déia, Carol, Bruno e Same pela amizade e apoio em mim depositados, pela companhia e pelos momentos de descontração que sempre me alegraram muito e aliviaram os desafios que a vida me apresentava.

À vocês estimo mais que minha gratidão terão sempre minha eterna amizade. Agradeço também à Deus por ter me dado plenas condições de saúde para realizar tudo isso.

NASCIMENTO, Raul Henrique Cardoso. **Diversidade de espécies do “complexo *Astyanax scabripinnis*” (Characiformes, Characidae) na bacia do rio Tibagi e bacias adjacentes, Paraná, Brasil.** 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Na região Neotropical, Characiformes é uma das ordens que se destacam quanto ao número de espécies, com *Astyanax* como o gênero com a mais ampla distribuição geográfica e com mais de 140 espécies válidas, entre as quais *A. scabripinnis*. Em 1927, Eigenmann descreveu cinco subespécies de *Astyanax scabripinnis*, o que posteriormente levou a criação do “complexo *A. scabripinnis*”, composto atualmente por 25 espécies distribuídas no Brasil e Argentina. Exemplares coletados no rio Tibagi pertencentes a esse complexo de espécies são identificados como *Astyanax paranae*, espécie descrita por Eigenmann em 1914, com a bacia do rio Tibagi, no município de Castro, Paraná, determinada como sua localidade tipo. Porém, esses exemplares apresentam diferenças morfológicas consideráveis, o que dificulta a identificação dos mesmos como uma única espécie. Além disso, estudos recentes mostram uma semelhança genética entre *Astyanax bockmanni* e algumas espécies do “complexo *A. scabripinnis*”. Métodos genéticos e morfológicos foram empregados para identificar se os diferentes morfótipos compreendem a mais de uma espécie. A análise a partir dos dados morfológicos indicou diferenças significativas entre alguns grupos, enquanto outros possuem uma forma similar. A partir das análises moleculares, *Astyanax paranae* mostrou diferenças significativas com relação as outras espécies, já *Astyanax bockmanni* exibiu pouca divergência genética quando comparado a *Astyanax* sp.1, porém morfológicamente distinto de todas as espécies. Deste modo, a partir da integração de análises morfométricas e moleculares, *Astyanax paranae* foi determinada como espécie amplamente distribuída, *Astyanax bockmanni* como membro do “complexo *A. scabripinnis*”, e ainda duas novas espécies de *Astyanax* foram identificadas.

Palavras-chave: Análise morfométrica multivariada. Complexo de espécies. DNA *barcoding*. GMYC. Taxonomia integrativa.

NASCIMENTO, R.H.C. **Species diversity of “*Astyanax scabripinnis* complex” (Characiformes, Characidae) in the basin of Tibagi river and adjacent basins, Paraná, Brazil.** 2016. 64 p. Dissertation (Master’s Degree in Biological Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

In the Neotropical region, Characiformes is one of the major orders regarding number of species, with *Astyanax* representing the genus with a wider geographic distribution, counting with more than 140 species, between them, *A. scabripinnis*. In 1927, Eigenmann described five subspecies of *Astyanax scabripinnis*, which posteriorly led to the creation of “*A. scabripinnis* complex”, currently with 25 species widely spread through Brazil and Argentina. Samples collected at Tibagi river belonging to this species complex, are identified as *Astyanax paranae*, species described by Eigenmann in 1914 having the Tibagi river basin as type locality, Castro city, Paraná. However, those samples presents considerable morphological differences, which makes difficult to consider all them as same species. In addition, current studies has shown a genetic similarity between *Astyanax bockmanni* and some species from the “*A. scabripinnis* complex”. Genetics and morphological methods were used to identify if the different morphotypes represents more than a unique species. The analyses based on morphological data pointed out significant differences between some groups, while others has a similar form. From molecular analyses, *Astyanax paranae* showed significant differences regarding the other species; *Astyanax bockmanni* showed little genetic divergence in comparison to *Astyanax* sp.1, but morphologically distinct of all the other species. Therefore, by the integration of all morphometric and molecular analyses, *Astyanax paranae* was defined as specie widely distributed, *Astyanax bockmanni* as member belonging to the “*A. scabripinnis* complex”, and two other new species were identified.

Keywords: Multivariate morphometric analysis. Species complex. DNA barcoding. GMYC. Integrative taxonomy.

SUMÁRIO

Capítulo I	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 Diversidade de peixes.....	1
1.1.2 Gênero <i>Astyanax</i>	1
1.1.3 Morfometria geométrica.....	10
1.1.4 DNA <i>barcoding</i> e análise de delimitação de espécies	11
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
Capítulo II	20
2.1 INTRODUÇÃO	21
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.2.1 Área de amostragem.....	25
2.2.2 Amostragem	25
2.2.3 Morfometria geométrica.....	27
2.2.4 Análises moleculares	31
2.2.4.1 Extração, amplificação e sequenciamento.....	31
2.2.4.2 Qualidade das sequências e Análises de distância genética	32
2.2.4.3 Análises filogenéticas e Delimitação das espécies.....	32
2.3 RESULTADOS	33
2.3.1 Morfometria geométrica.....	33
2.3.2 Análises moleculares	40
2.3.2.1 Análises de distância genética	40
2.3.2.2 Análises filogenéticas e Delimitação das espécies.....	42
2.3.3 Distribuição geográfica das amostras.....	44
2.4 DISCUSSÃO	47
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE	61

Capítulo I

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Diversidade de peixes

Os peixes são o grupo com maior número de espécies descritas dentre todos os vertebrados, sendo reconhecidas atualmente mais de 33 mil espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2016). Ocorrem nos diferentes ambientes aquáticos, sendo os ambientes dulcícolas detentores de aproximadamente metade dessa diversidade, abrigando 47,3% das espécies (Eschmeyer *et al.*, 2010).

Dentre a grande diversidade de espécies de peixes de água doce na região Neotropical, duas ordens se destacam com um grande número de espécies, os Characiformes, com 3493 spp. e os Siluriformes, com 6069 spp. (Eschmeyer & Fong, 2016). Com uma grande variedade em suas formas e tamanhos corporais, os Characiformes são encontrados em rios e lagos da região Neotropical e do continente africano (Géry, 1977). Dentro de Characiformes, a família Characidae apresenta-se como a família mais diversificada da ordem (Reis *et al.*, 2003), atualmente com mais de 1100 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2016). Além de bastante numerosa, a família Characidae apresenta um grande número de problemas com relação à sua sistemática e taxonomia, as relações entre os grupos dentro da família não são ainda bem estabelecidas, possivelmente devido ao fato do grupo não ser monofilético (Buckup, 1999).

1.1.2 Gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax*, proposto por Baird & Girard (1854) a partir da descrição de *Astyanax argentatus* (= *A. mexicanus*), é definido por uma combinação de caracteres, dos quais se destacam: duas fileiras de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna, linha lateral completa,

nadadeira adiposa presente e nadadeira caudal sem revestimento de escamas (Eigenmann, 1917; 1927). Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América do Sul, Central e sul da América do Norte (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Lima *et al.*, 2003) e conta atualmente com 141 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2016). De acordo com muitos autores, *Astyanax* não forma um grupo monofilético (Rosen, 1972; Weitzman & Malabarba, 1998; Calcagnotto *et al.*, 2005; Vari & Castro, 2007; Mirande, 2010; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Em uma filogenia de Characidae, Mirande (2009) incluiu a espécie tipo do gênero em um grupo denominado "Clado *Astyanax*" com base na análise de apenas algumas espécies de *Astyanax*, junto com *Astyanacinus*, e algumas espécies de *Bryconamericus*, *Ctenobrycon*, *Hyphessobrycon*, *Markiana* e *Psellogrammus*. Todos esses gêneros haviam sido indicados como "Incertae Sedis" em Characidae por Lima *et al.* (2003). *Astyanax* foi considerado então como gênero não monofilético pela hipótese de filogenia morfológica de Mirande (2009), o que foi corroborado por Javonillo *et al.*, (2010) com base em filogenia molecular a partir de três regiões mitocondriais (12S, 16S e COI) e uma região do DNA nuclear (RAG2).

Jenyns (1842) descreveu uma espécie inicialmente com o nome de *Tetragonopterus scabripinnis*, agora denominada *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921) utilizando um indivíduo coletado na cidade do Rio de Janeiro por Charles Darwin no ano de 1832 durante sua expedição realizada no Brasil. Recentemente, a espécie teve a localidade-tipo determinada como a cidade do Rio de Janeiro, onde é considerada extinta (Lima *et al.*, 2007).

Na publicação de 1927, Eigenmann reconheceu cinco subespécies de *Astyanax scabripinnis*. Posteriormente, Moreira-Filho & Bertollo (1991) estudaram sete populações de *Astyanax scabripinnis* de cabeceiras de riachos da bacia do rio São Francisco e do Alto rio Paraná e sugeriram, com base em caracteres morfológicos e cromossômicos, a existência do "complexo *A. scabripinnis*", composto por 12 espécies. Bertaco & Malabarba (2001) e Bertaco & Lucena (2006) revisaram as espécies do complexo e descreveram mais quatro espécies, além de definirem as

características morfológicas desse complexo. Os caracteres diagnósticos do complexo, de acordo com Bertaco & Lucena (2006), são os mesmos utilizados para reconhecer *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921): corpo mais profundo e mais robusto próximo ao meio das nadadeiras peitorais, cabeça robusta, focinho curto (menor que o diâmetro orbital) de perfil abrupto, profundidade corporal menor do que 41% do comprimento padrão, número reduzido de raios ramificados da nadadeira anal (13-21, sendo mais comum entre 17 a 18 e raramente 22 a 23 raios), presença de uma ou duas manchas umerais, e uma linha escura no meio do corpo que se estende até a ponta dos raios médios da nadadeira caudal. As espécies do complexo apresentam ainda a peculiaridade de serem encontradas em pequenos riachos com corredeiras, limitando-se às regiões de cabeceiras (Gomes & Azevedo, 1960; Britski, 1972).

De acordo com esses caracteres, atualmente encontram-se descritas 25 espécies para o “complexo *A. scabripinnis*”: *Astyanax brachypterygium* Bertaco & Malabarba, 2001; *Astyanax burgerai* Zanata & Camelier, 2009; *Astyanax courensis* Bertaco, Carvalho & Jerep, 2010; *Astyanax cremnobates* Bertaco & Malabarba, 2001; *Astyanax epiagos* Zanata & Camalier, 2008; *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944); *Astyanax guaricana* Oliveira, Abilhoa & Pavanelli, 2013; *Astyanax intermedius* Eigenmann, 1908; *Astyanax ita* Almirón, Azpelicueta & Casciotta, 2002; *Astyanax jenynsii* (Steindachner, 1877); *Astyanax jordanensis* Alcaraz, Pavanelli & Bertaco, 2009; *Astyanax laticeps* (Cope, 1894); *Astyanax leonidas* Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002; *Astyanax microschemos* Bertaco & Lucena, 2006; *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870); *Astyanax ojiara* Azpelicueta & Garcia, 2000; *Astyanax paranae* Eigenmann, 1914; *Astyanax paris* Azpelicueta, Almirón & Casciotta, 2002; *Astyanax pirabitira* Lucena, Bertaco & Berbigier, 2013; *Astyanax pirapuan* Tagliacollo, Britzke, Silva & Benine, 2011; *Astyanax rivularis* (Lütken, 1875); *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842); *Astyanax totae* Haluch & Abilhoa, 2005; *Astyanax troya* Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002 e *Astyanax varzeae* Abilhoa & Duboc, 2007 (Figuras 1, 2 e 3).

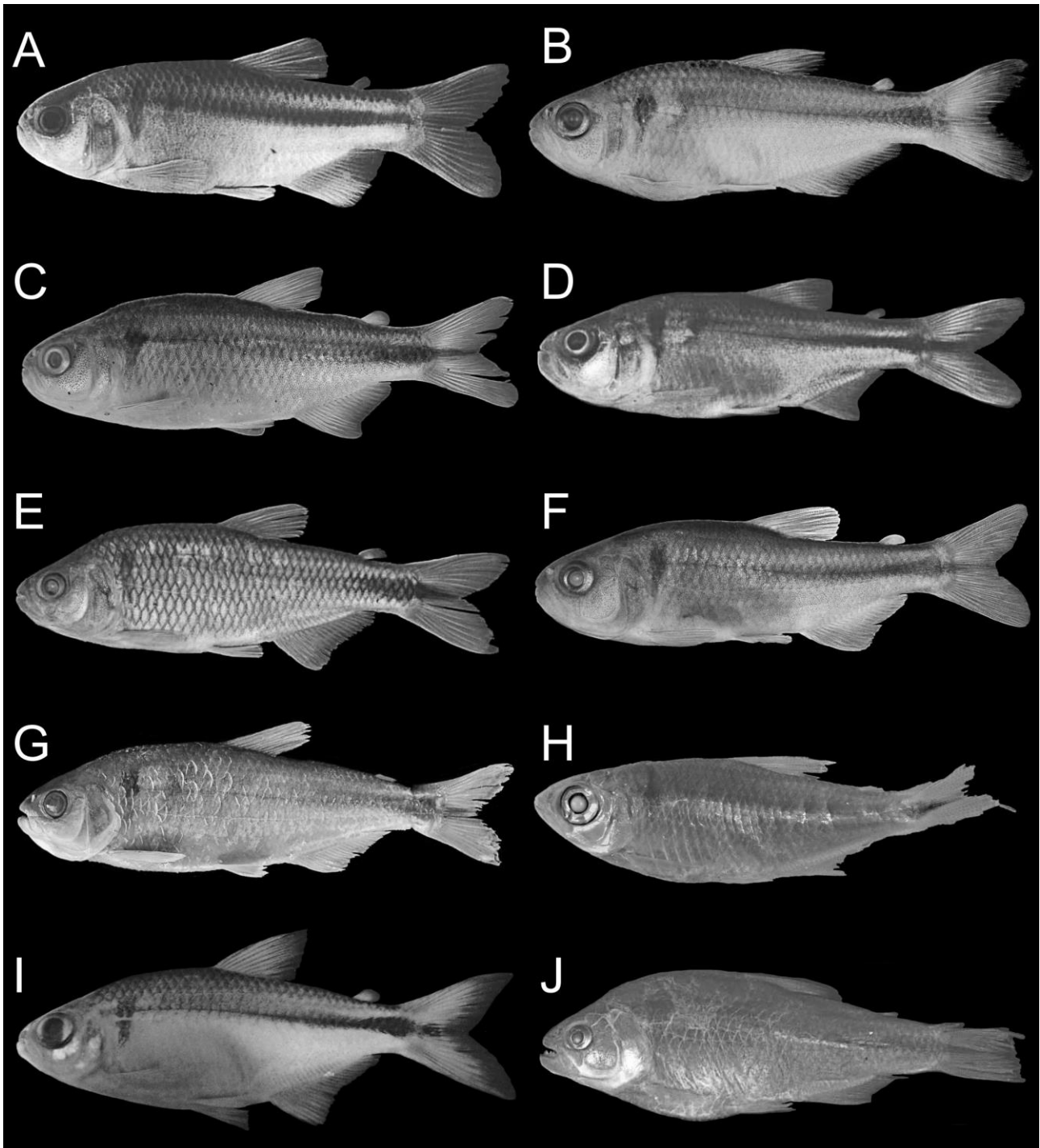


Figura 1. Exemplos representativos do “complexo *A. scabripinnis*”. A: *Astyanax brachypterygium* (MCP 26094, holótipo, 40,8 mm, Bertaco & Malabarba, 2001), B: *Astyanax burgerai* (MZUSP 101245, holótipo, 53,2 mm, Zanata & Camelier, 2009), C: *Astyanax courensis* (UFRGS 11499, holótipo, 54,2 mm, Bertaco, Carvalho & Jerep, 2010), D: *Astyanax cremnobates* (MCP 26093, holótipo, 43,8 mm, Bertaco & Malabarba, 2001), E: *Astyanax epiagos* (MZUSP 89568, holótipo, 59,3 mm, Zanata & Camelier, 2008) e F: *Astyanax goyanensis* (UFRGS 11291, topótipo, 56,7 mm, Bertaco, Carvalho & Jerep, 2010), G: *Astyanax guaricana* (MZUSP 112224, holótipo, 95,6 mm, Oliveira, Abilhoa & Pavanelli, 2013), H: *Astyanax intermedius* (MCZ 20684, Lectótipo, Museum of Comparative Zoology – Harvard University), I: *Astyanax ita* (MLP 9599, holótipo, 64,0 mm, Almirón, Azpelicueta & Casciotta, 2002), J: *Astyanax jenynsii* (NMW 57534, sintipo, 76,2 mm, Bertaco & Malabarba, 2001).

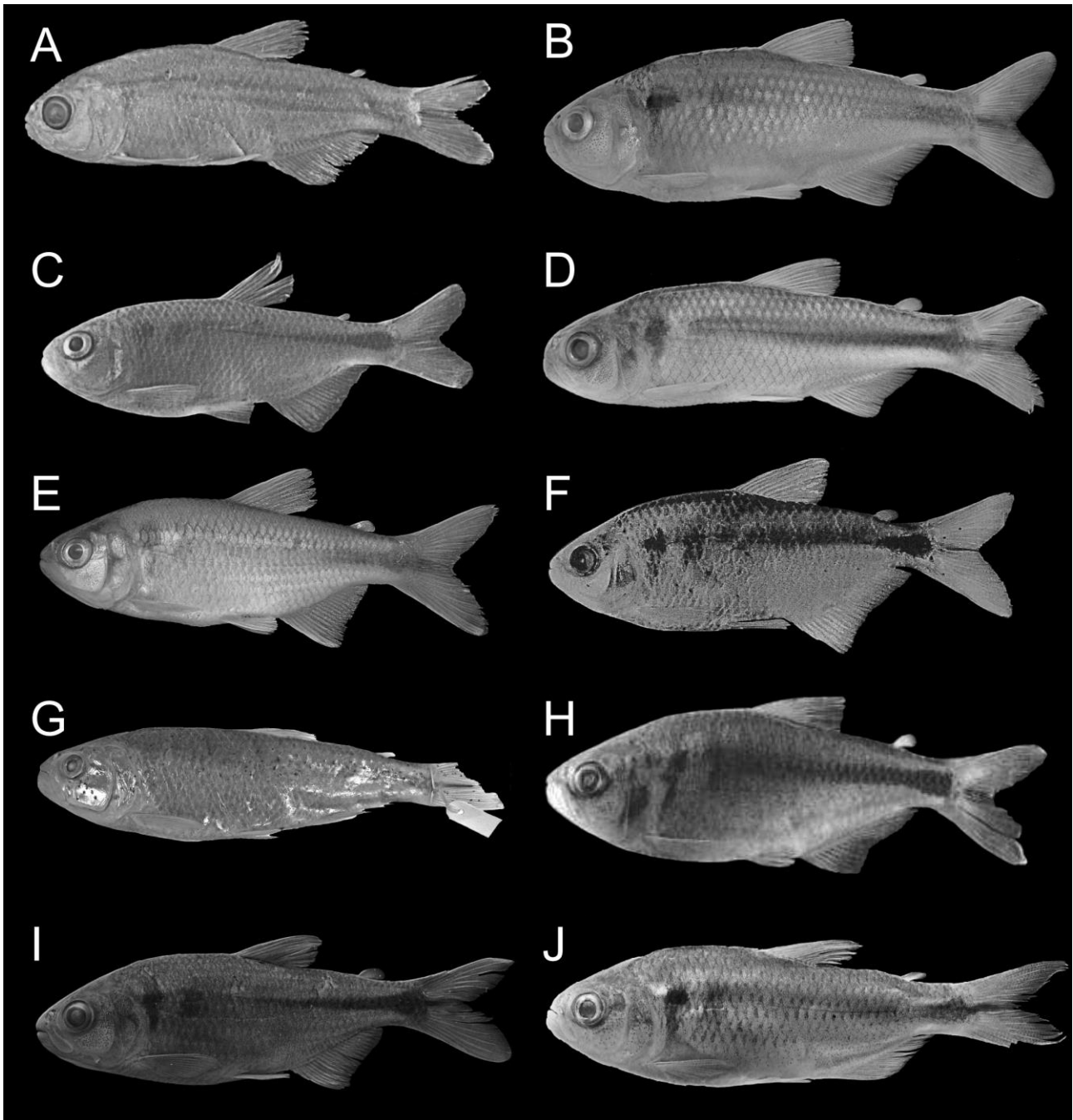


Figura 2. Exemplos representativos do “complexo *A. scabripinnis*”. A: *Astyanax jordanensis* (MZUSP 99137, holótipo, 47,7 mm, Alcaraz, Pavanelli & Bertaco, 2009), B: *Astyanax laticeps* (MCP 35425, 61,2 mm, Bertaco & Lucena, 2010), C: *Astyanax leonidas* (MLP 9580, holótipo, 45,6 mm, Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002), D: *Astyanax microschemos* (MCP 37569, holótipo, 55,1 mm, Bertaco & Lucena, 2006), E: *Astyanax obscurus* (MCP 40000, 59,2 mm, Bertaco & Lucena, 2010) e F: *Astyanax ojiara* (MLP 9470, holótipo, 50,5 mm, Azpelicueta & Garcia, 2000), G: *Astyanax paranae* (CAS 22555, holótipo, 111,0 mm, California Academy of Sciences in San Francisco, Califórnia), H: *Astyanax paris* (MLP 9584, holótipo, 75,6 mm, Azpelicueta, Almirón & Casciotta, 2002), I: *Astyanax pirabityra* (MCP 47707, holótipo, 53,9 mm, Lucena, Bertaco & Berbigier, 2013), J: *Astyanax pirapuan* (MNRJ 37621, holótipo, 45,4 mm, Tagliacollo, Britzke, Silva & Benine, 2011).

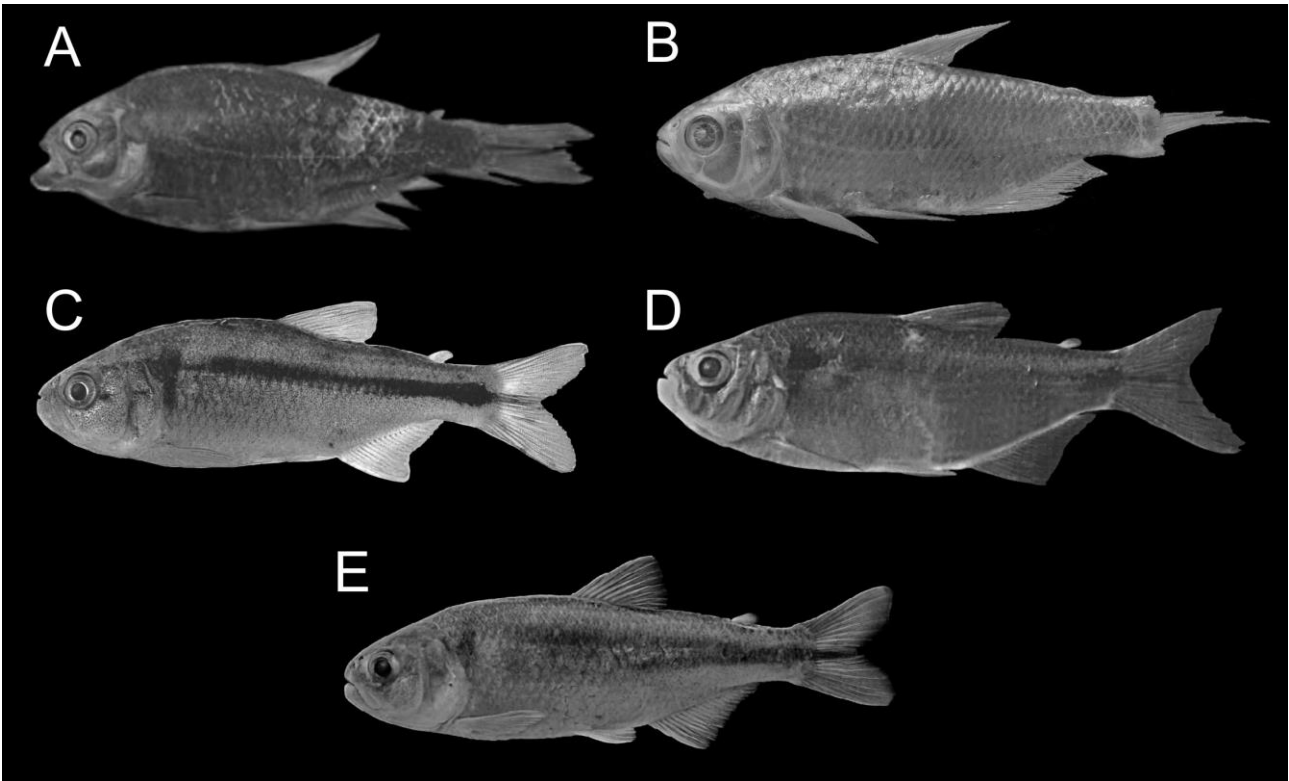


Figura 3. Exemplos representativos do “complexo *A. scabripinnis*”. A: *Astyanax rivularis* (MNHN 9582, holótipo, Muséum national d'Histoire naturelle de Paris), B: *Astyanax scabripinnis* (BMNH 1917.7.14.15, 71,6 mm, The Trustees of the Natural History Museum, London), C: *Astyanax totae* (MHNCI 10305, holótipo, 61,1 mm, Haluch & Abilhoa, 2005), D: *Astyanax troya* (MACN 8310, holótipo, 73,8 mm, Azpelicueta, Casciotta & Almirón, 2002), E: *Astyanax varzea* (MHNCI 11688, holótipo, 83,1 mm, Abilhoa & Duboc, 2007).

As espécies de *Astyanax* do “complexo *A. scabripinnis*” encontram-se amplamente distribuídas, sendo descritas para oito estados brasileiros, tais como Mato Grosso, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, e também no nordeste da Argentina (Tabela 1, Figura 4).

Tabela 1. Localidades-tipo das espécies de *Astyanax* do “complexo *A. scabripinnis*”.

Espécie	Localidade-tipo
<i>Astyanax brachypterygium</i>	Arroio Água Branca, Bom Jesus, Rio Grande do Sul.
<i>Astyanax burgerai</i>	Córrego agua boa, estrada entre Floresta Azul e Almadina, tributário do riacho Pancadinha, tributário do rio Almada, Almadina, Bahia.
<i>Astyanax courensis</i>	Rio dos Couros no Parque Portal da Chapada, tributário do rio Tocantinzinho, bacia do alto rio Tocantins, Goiás.
<i>Astyanax cremnobates</i>	Tributário do rio Santa Cruz, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul.
<i>Astyanax epiagos</i>	Rio Ferro Doido, acima da Cachoeira do Ferro Doido, tributário do rio Jacuípe, drenagem Paraguaçu, Morro do Chapéu, Bahia.
<i>Astyanax goyanensis</i>	Tributário do rio dos Couros no Parque Portal da Chapada, afluente do rio Tocantinzinho, bacia do alto rio Tocantins, Goiás.
<i>Astyanax guaricana</i>	Afluente do rio Cubatão, reservatório de Guaricana, Arraial, São José dos Pinhais, Paraná.
<i>Astyanax intermedius</i>	Rio Paraíba do Sul, próximo a cidade do Rio de Janeiro
<i>Astyanax ita</i>	Arroio Tateto, cabeceira do arroio Deseado, bacia do rio Iguaçu, Província de Misiones, Argentina.
<i>Astyanax jenynsii</i>	Rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro.
<i>Astyanax jordanensis</i>	Médio rio Jacu, bacia do rio Iguaçu, Candói, Paraná.
<i>Astyanax laticeps</i>	Rio grande do Sul, Porto Alegre.
<i>Astyanax leonidas</i>	Cabeceiras do arroio Urugua-í, Província de Misiones, bacia do rio Paraná, Argentina.
<i>Astyanax microschemos</i>	Córrego Palmital, drenagem do rio Itapemirim, Iúna, Espírito Santo.
<i>Astyanax obscurus</i>	Rio cadeia, tributário do rio Caí, bacia do rio Jacuí, acima da grande cachoeira, Rio Grande do Sul.
<i>Astyanax ojiara</i>	Cabeceira do rio Yaboty, afluente do rio Uruguai, arroio Benítez, Província de Misiones, Argentina.
<i>Astyanax paranae</i>	Castro-PR
<i>Astyanax paris</i>	Arroio Fortaleza, cabeceira do arroio Yabotí-Guazú, bacia do rio Uruguai, Província de Misiones, Argentina.
<i>Astyanax pirabitira</i>	Fronteira entre Cambará do Sul e Bom Jesus, rio das Antas, drenagem do rio Jacuí, Sistema da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul.
<i>Astyanax pirapuan</i>	Rio Aricá-Mirim, bacia do rio Cuiabá, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso.
<i>Astyanax rivularis</i>	Rio das Velhas, bacia do rio São Francisco, Lagoa Santa, Minas Gerais.
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Rio de Janeiro, Brasil
<i>Astyanax totae</i>	Rio Cascata, tributário do rio Tortuoso, afluente do rio Iguaçu, Balsa Nova, Paraná.
<i>Astyanax troya</i>	Afluente do rio Paraná, arroio Cuñupurú Chico, Província de Misiones, Argentina.
<i>Astyanax varzeae</i>	Rio São João, cabeceiras do rio da Várzea, afluente do rio Negro, bacia do alto rio Iguaçu, Tijucas do Sul, Paraná.

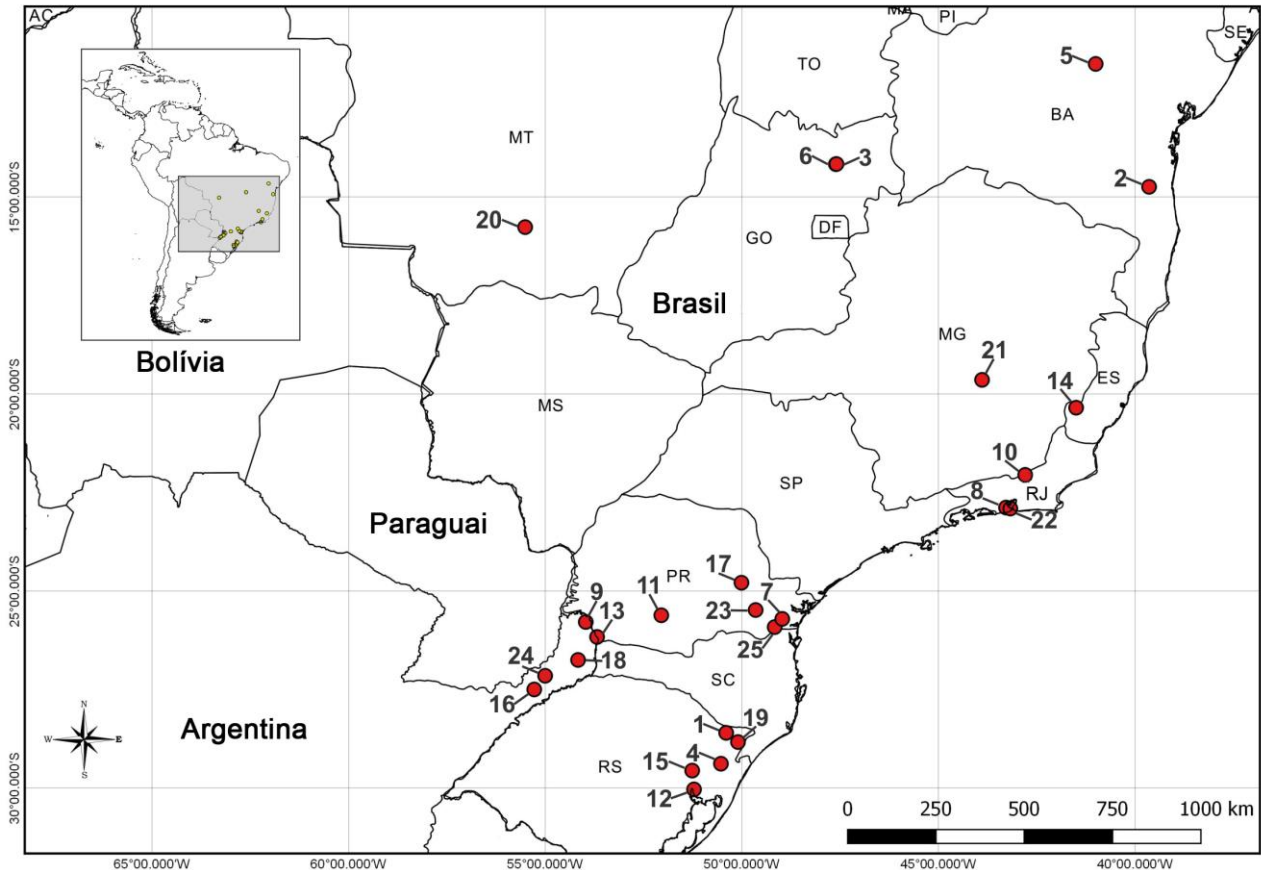


Figura 4. Mapa com as localidades-tipo das espécies do “complexo *A. scabripinnis*”. 1: *Astyanax brachypterygium*, 2: *Astyanax burgerai*, 3: *Astyanax courensis*, 4: *Astyanax cremnobates*, 5: *Astyanax epiagos*, 6: *Astyanax goyanensis*, 7: *Astyanax guaricana*, 8: *Astyanax intermedius*, 9: *Astyanax ita*, 10: *Astyanax jenynsii*, 11: *Astyanax jordanensis*, 12: *Astyanax laticeps*, 13: *Astyanax leonidas*, 14: *Astyanax microschemos*, 15: *Astyanax obscurus*, 16: *Astyanax ojiara*, 17: *Astyanax paranae*, 18: *Astyanax paris*, 19: *Astyanax pirabitiba*, 20: *Astyanax pirapuan*, 21: *Astyanax rivularis*, 22: *Astyanax scabripinnis*, 23: *Astyanax totae*, 24: *Astyanax troya*, 25: *Astyanax varzea*.

Exemplares de *Astyanax* pertencentes ao “complexo *A. scabripinnis*” são comumente coletados ao longo da bacia do rio Tibagi, e têm sido identificados como *Astyanax paranae*, seguindo Eigenmann (1914) que define a espécie pelo número de raios da nadadeira anal, escamas do pedúnculo caudal e altura do corpo. Esse autor descreveu a espécie inicialmente como uma subespécie de *Astyanax scabripinnis*, utilizando indivíduos de diferentes bacias e definindo a localidade-tipo de maneira imprecisa, apenas como “Paraná”. Porém, Garutti & Britski, 2000 analisando os exemplares da série típica que atualmente encontram-se depositados nas coleções da *California Academy of Sciences* (holótipo: CAS 22555, parátipos: CAS 22556) observaram as

etiquetas originais do Museu Paulista e também documentos do antigo Museu Paulista e da Seção de Peixes do MZUSP, e determinaram a localidade-tipo da espécie como a cidade de Castro, no Paraná, bacia do rio Tibagi. No entanto, os caracteres morfológicos que definem a espécie possuem uma grande amplitude de variação, talvez devido ao fato de terem sido utilizados exemplares de diferentes bacias na série tipo, como por exemplo, as bacias do rio Paranaíba e Iguaçu, o que ampliaria a variância nos caracteres. Assim, esses caracteres têm se mostrado ineficientes para diferenciar a espécie de outros morfótipos coletados na bacia do rio Tibagi, permitindo a inclusão de espécies morfológicamente similares nessa diagnose.

Para a bacia do rio Tibagi, Shibatta *et al.* (2002) registraram a ocorrência de *A. paranae* entre as poucas espécies que ocorreram exclusivamente em riachos das regiões média e baixa. Veregue & Orsi (2003) observaram a preferência da espécie por rios de menor porte em áreas de cabeceira que apresentam águas correntes entre remansos, como apontado anteriormente para *A. scabripinnis*.

A bacia do rio Tibagi percorre três formações geológicas distintas, o primeiro, o segundo e o terceiro planaltos paranaenses (França, 2002). Essa variação na formação geomorfológica da bacia pode interferir diretamente na distribuição das espécies, podendo causar isolamento geográfico e conseqüentemente reprodutivo dessa espécie que prefere ambientes de cabeceiras, levando à estruturação genética, o que ocasionalmente pode incorrer em um processo de especiação.

Um outro congênere, *Astyanax bockmanni* Vari & Castro, 2007 descrito para o rio Paranaíba demonstrou uma baixa divergência genética interespecífica para o gene mitocondrial COI com espécies do “complexo *A. scabripinnis*” (*Astyanax intermedius*, *Astyanax rivularis*, *Astyanax paranae* e *Astyanax scabripinnis*) (Rossini, 2015), o que sugere que mesmo essa espécie não possuindo todas as características morfológicas que definem o “complexo *A. scabripinnis*”, pode fazer parte desse complexo pela semelhança genética com seus membros. Isso evidencia a

necessidade de uma revisão das espécies do grupo e a definição da espécie *A. paranae*, buscando caracteres que permitam separá-la efetivamente de outras espécies do complexo.

1.1.3 Morfometria geométrica

Para buscar identificar as diferenças na forma apresentada pelos diferentes morfótipos, a utilização de uma metodologia denominada morfometria geométrica, na qual considera forma “todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação” nos organismos (Bookstein, 1989) pode ser utilizada apresentando resultados bastante informativos. Utilizada pela primeira vez na tentativa de caracterização geométrica das diferenças entre formas biológicas, um trabalho apresentado por Albrecht Dürer no ano de 1524 mostrou uma caracterização geométrica da forma humana e suas variações por meio de deformações sobre uma grade sobreposta. Somente muitos anos depois, em 1917, a variação e mudança da forma biológica como um tema formal foi discutido no campo da biometria no trabalho “*On Growth and Form*” realizado por D’Arcy W. Thompson (Monteiro & Reis, 1999).

Anos mais tarde, em 1971, o primeiro trabalho explicitamente morfométrico foi publicado por Blackith & Reymonte (1971). Porém, a análise possuía alguns problemas, principalmente relacionados ao conjunto de dados. Então, vários estudos foram realizados no sentido de corrigi-los e, já na década de 80, a limitação da análise morfométrica foi superada em vários centros de pesquisa. Um método geométrico que utilizava marcos anatômicos foi criado por Bookstein em 1984, mas somente no início dos anos 90, ocorreu um avanço no conhecimento e utilização dessa técnica. Porém, a análise ainda não estava acessível à maioria dos pesquisadores, quando a “*National Science Foundation*” promoveu uma série de *workshops* em morfometria nos Estados Unidos. No primeiro desses eventos, o pesquisador F. James Rohlf interessou-se pelo assunto, começando a desenvolver programas computacionais que realizassem as análises geométricas. Esse passo contribuiu para a popularização do método na comunidade científica, uma vez que F. J. Rohlf

disponibilizou programas para análises morfométricas livremente pela internet (Monteiro & Reis, 1999).

Análises de morfometria geométrica em peixes tem sido muito utilizadas em trabalhos recentes para determinar diferenças em suas formas, fornecendo informações morfológicas e auxiliando na identificação de novas espécies (Berbel-Filho *et al.*, 2016; Geiger *et al.*, 2016). A partir desse tipo de análise, e também de análises citogenéticas e moleculares, Castro *et al.* (2014) encontraram diferenças significativas entre quatro populações do “complexo *A. scabripinnis*”, permitindo concluir que essas populações estavam em processo de especiação.

1.1.4 DNA *barcoding* e análise de delimitação de espécies

No contexto de identificação de espécies, técnicas moleculares baseadas em DNA têm se destacado no auxílio à resolução de problemas taxonômicos. Em especial, uma metodologia proposta por Herbert *et al.* (2003) denominada DNA *barcoding*, tem demonstrado resultados satisfatórios na discriminação de várias espécies animais (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005), até mesmo frente à uma fauna megadiversa como no caso dos peixes no Brasil (Pereira *et al.*, 2013).

Essa metodologia busca associar sequências de um trecho do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) com pouca ou nenhuma variação em uma espécie, o que possibilita sua utilização na identificação de unidades taxonômicas únicas. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência dessa metodologia na discriminação da diversidade da ictiofauna tanto na região neotropical, quanto em outras regiões zoogeográficas (Ward *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Frantine-Silva *et al.*, 2015).

Análises moleculares a partir de dados de um único loco, como é o caso do DNA *barcoding*, fornecem informações sobre um registro genético de histórias evolutivas (Avice, 2009) que podem ser usadas para avaliar os padrões evolutivos da diversidade através de grandes escalas (Monaghan

et al., 2009). Nesse sentido, métodos capazes delimitar as espécies a partir de dados de um único loco têm sido propostos.

Uma abordagem bastante convencional é a delimitação de espécies baseada em um percentual de corte na distância genética interespecífica. Muitos trabalhos utilizando essa metodologia têm sido realizados mostrando-se muito eficientes na identificação de espécies de diferentes grupos (em bactérias, Schloss & Handelsman 2006; em insetos, Brower, 1994; em borboletas, HEBERT *et al.*, 2004a; em pássaros, HEBERT *et al.*, 2004b; em larvas e peixes marinhos, WARD *et al.*, 2005; PEGG *et al.*, 2006; em peixes dulcícolas da região neotropical, CARVALHO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011, 2013).

Apesar desses trabalhos baseados em percentuais de corte de acordo com a distância genética funcionarem bem na prática, métodos evolutivos se fazem necessários para validar seu uso (Tang *et al.*, 2012). Recentemente, estudos utilizando métodos Bayesianos de delimitação de espécies utilizando sequências multilocus tem sido propostos no sentido dessa otimização (O'Meara, 2010; Yang & Rannala, 2010), porém, exigem uma enorme capacidade computacional de análise para que se possa aplicar em um grande conjunto de dados.

Possibilitando analisar um grande número de amostras, por utilizar informações de apenas um loco, o modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*), criado por Pons *et al.*, 2006 e Fontaneto *et al.*, 2007, baseia-se na delimitação das espécies considerando que elas evoluem de forma independente. Essa ideia de “evolução independente das espécies”, significa que novas mutações que surgem numa determinada espécie não consegue se espalhar rapidamente em outra espécie (Templeton, 1989; Barraclough *et al.*, 2003; De Queiroz, 2007). Desse modo, o método GMYC considera que essa evolução independente leva ao aparecimento de agrupamentos genéticos distintos que se separam por longos ramos nas árvores (Barraclough *et al.*, 2003; Acinas *et al.*, 2004). Uma vantagem do GMYC sobre outros métodos com princípios semelhantes já propostos, é

o fato de permitir inferências estatísticas e testes de hipóteses em todos os clados testados (Birky *et al.*, 2010; Tang *et.al.*, 2012).

O método de delimitação de espécies baseado no modelo GMYC tem sido aplicado em trabalhos moleculares que analisam um único loco em diversos organismos (Fontaneto *et.al.*, 2007; Lahaye *et.al.*, 2008; Papadopoulou *et al.*, 2008), inclusive em grupos complexos de peixes (Costa-Silva *et.al.*, 2015) e demonstrado bastante eficiência, uma vez que análises a partir do modelo GMYC, são muito eficientes na identificação de espécies, até mesmo em grupos hiperdiversos (Ratnasingham & Herbert, 2013) como é o caso de *Astyanax*.

Considerando a variação morfológica apresentada pelos exemplares do “complexo *A. scabripinnis*” da bacia do rio Tibagi, o presente estudo visa determinar se os exemplares coletados nos diferentes locais ao longo da bacia do rio Tibagi e áreas adjacentes compreendem a mais de uma espécie.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilhoa, V. A., Duboc, L. F. 2007. A new species of the freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Zootaxa**, 1587: 43-52.
- Acinas, S. G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L., Polz, M. F. 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. **Nature**, 430:551–554.
- Alcaraz, H. S. V., Pavanelli, C. S., Bertaco, V. A. 2009. *Astyanax jordanensis* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Iguaçu basin, Paraná, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7: 185-190.
- Almirón, A. E., Azpelicueta, M., Casciotta, J. R. 2002. *Astyanax ita* sp. n.-a new species from the Río Iguazú basin, in Argentina (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Zoologische Abhandlungen-Staatliches Museum Fur Tierkunde in Dresden**, 52:3-10.
- Azpelicueta, M. M., Casciotta, J. R., Almiron, A. E. 2002. Two new species of the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Paraná river basin in Argentina. **Revue suisse de Zoologie**, 109: 243-259.
- Azpelicueta, M. M., Garcia, J. O. 2000. A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from Uruguay river basin in Argentina, with remarks on hook presence in Characidae. **Revue suisse de Zoologie**, 107: 245-258.
- Azpelicueta, M. M., Almirón, A. E., Casciotta, J. R. 2002 *Astyanax paris*: a new species from the Río Uruguay basin of Argentina (Characiformes, Characidae). **Copeia**, v. 2002:1052-1056.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of biogeography**, 36:3–15.
- Baird, S. F., Girard, C. F. 1854. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the US and Mexican boundry survy and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet and Charles Girard: **Proceedings of Academy of Natural Sciences**, March 1854, USA.
- Barraclough, T. G., Birky, C. W. JR., Burt, A. 2003. Diversification in sexual and asexual organisms. **Evolution**, 57:2166–2172.
- Berbel-Filho, W. M., Martinez, P. A., Ramos, T. P., Torres, R. A., Lima, S. M. 2016. Inter-and intra-basin phenotypic variation in two riverine cichlids from northeastern Brazil: potential eco-evolutionary damages of São Francisco interbasin water transfer. **Hydrobiologia**, 1: 43-56.
- Bertaco, V. A., Carvalho, F. R., Jerep, F. C. 2010. *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8:265-275.
- Bertaco, V. A., Lucena, C. A. S. 2010. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894)(Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8: 7-20.

- Bertaco, V. A., Lucena, C. A. S. 2006. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* complex. **Neotropical Ichthyology**, 4: 53-60.
- Bertaco, V. A., Malabarba, L. R. 2001. Description of two new species of *Astyanax* Baird & Girard (Teleostei: Characiformes: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the. **Ichthyological Exploration Freshwaters**, 12: 221-234.
- Birky, C. W. JR., Adams, J., Gemmel, M., Perry, J. 2010. Using population genetic theory and dna sequences for species detection and identification in asexual organisms. **Plos One**, 5:e10609.
- Blackith, R. E., Reyment, R. A. 1971. **Multivariate morphometrics**.
- Bookstein, F. L. 1989. "Size and shape": a comment on semantics. **Systematic Biology**, 2: 173-180.
- Britski, H. A. 1972. Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: **Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública /USP – Instituto de Pesca/CPRN. p. 79-108.
- Brower, A. V. Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial-DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 6491–6495.
- Buckup, P. A. 1999. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. **Oecologia Brasiliensis**, 1: 3.
- Calcagnotto, D., Schaefer S. A., Desalle R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 135-153.
- Carvalho, D., Denise, A. A. O., Pompeu, O. S., Leal, C. G., Oliveira, C., Hanner, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, 22: 80–86.
- Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O.A., Santos, M. H., Nogaroto, V., Vicari, M. R., Almeida, M. C., Artoni, R. F. 2014. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 25: 231-244.
- Costa-Silva, G. J., Rodriguez, M. S., Roxo, F. F., Foresti, F., Oliveira, C. 2015. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. **Plos one**, 9: e0135075.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, 56: 879–886.
- Eigenmann, C. H. 1914. Some results from studies of South American fishes IV. **New genera and species os South American fishes**. *Indiana University Studies*, 20: 44-48.
- Eigenmann, C. H. 1917. The American Characidae. Part 1. **Memoirs of Museum of Comparative Zoology**, 43: 1-102.
- Eigenmann, C. H. 1921. The American Characidae. Part 3. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, 43: 208-310.

- Eigenmann, C. H. 1927. The American Characidae. Part 4. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, 43: 311-428.
- Eschmeyer, W. N., Fong, J. D. 2016. Species by family/subfamily. **Catalog of Fishes endereço eletrônico**: <http://research.calacademy.org> (acessado em 19 de fevereiro de 2016).
- Eschmeyer, W. N., Fricke, R., Fong, J. D., Polack, D. A. 2010. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, 2525: 19-50.
- Fontaneto, D., Herniou, E. A., boschetti, C., caprioli, M., melone, G., ricci, C., barraclough, T. G. 2007. Independently evolving species in a sexual bdelloid rotifers. **PLoS Biol**, 5: e87
- França, D. V. 2002. O rio Tibagi no contexto hidrogeográfico paranaense, em: Medri, ME.; Bianchini, E.; Shibatta, O. A.; Pimenta, JA. **A bacia do rio Tibagi**, 595 p.
- Frantine-Silva, W., Sofia, S. H., Orsi, M. L., Almeida, F. S. 2015. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Molecular ecology resources**, 5: 1226-1237.
- Garutti, V., Britski, H. A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, **Série Zoologia**, 13: 65-88.
- Geiger, M. F., Schreiner, C., Delmastro, G. B., Herder, F. 2016. Combining geometric morphometrics with molecular genetics to investigate a putative hybrid complex: a case study with barbels *Barbus* spp.(Teleostei: Cyprinidae). **Journal of fish biology**.
- Géry, J. 1977. Characoids of the world: 672 p. **Neptune City: TFH Publications**.
- Gomes, A. L., Azevedo, P. 1960. Os peixes de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. **Papéis Avulsos**, Departamento de Zoologia, SP 14: 133-151.
- HALUCH, Carolina Ferreira; ABILHOA, Vinícius. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei: Characidae) from the upper rio Iguazu basin, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 3, n. 3, p. 383-388, 2005.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. A. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of The Royal Society Series B: Biological Sciences**, 270: 313–334.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101: 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. **Plos Biology**, 2: 312.
- Javonillo, R., Malabarba, L. R., Weitzman, S. H., Burns, J. R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 498–511.
- Jenyns, L. 1842. Fish. In: Charles Darwin (ed). **The Zoology of the Voyage of HMS Beagle during the Years 1832-1836**. London. Smith, Elder & Co.

Lahaye, R., Vanderbank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105: 2923–2928.

Lima F. C. T., Buckup P. A., Menezes N. A., Lucena C. A. S., Lucena Z. M. S., Toledo-Piza M., Zanata A. 2007. Família Characidae: gêneros incertae sedis. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série Livros**, 23: 44-62.

Lima, F. C. T., Malabarba, R. L., Buckup, P. A., Pezzi, J. F. S., Vari, R. P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O. T., Pavanelli, C. S., Menezes, N. A., Lucena, C. A. S., Malabarba, M. C. S. L., Lucena, Z. M. S., Reis, R. E., Langeani, F., Casatti, L., Bertaco, V. A., Moreira, C., Lucinda, P. H. F. 2003. Genera incertae sedis in Characidae. Pp. 134-141. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, 729 p.

LUCENA, C. A. S.; BERTACO, Vinicius A.; BERBIGIER, Guilherme. A new species of *Astyanax* from headwater streams of southern Brazil (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, v. 3700, n. 2, p. 226-236, 2013.

Mirande, J. M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the Family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, 25: 1-39.

Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, 8: 385–568.

Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J. G., Lees, D. C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T. G., Vogler, A. P. 2009. Accelerated species inventory on madagascar usingcoalescent-based models of species delineation. **Systematic biology**, 58: 298–311.

Monteiro, L. R., Reis, S. F. D. 1999. **Princípios de morfometria geométrica. Holos**.

Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazil. J. Genetics** 14: 331-357.

O’Meara, B. C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. **Systematic Biology**, 59: 59–73.

Oliveira, C. A. M., Abilhoa, V., Pavanelli, C. S. 2013. *Astyanax guaricana* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Cubatão drainage, Paraná State, Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 11: 291-296.

Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K., Mariguela, T., Benine, R., Orti, G., Vari, R., Castro, R. M. C. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11: 1–25.

Papadopoulou, A., Bergsten, J., Fujisawa, T., Monaghan, M. T., Barraclough, T. G., Vogler, A. P. 2008. Speciation and DNA barcodes: testing the effects of dispersal on the formation of discrete sequence clusters. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 363: 2987–2996.

- Pegg, G. G., Sinclair, B., Briskey, L., Aspden, W. J. 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. **Scientia Marina**, 70: 7-12.
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC genetics**, 14: 20.
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 22: 71-79.
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W., Vogler, A. P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematics Biology**, 55: 595-609.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. 2013. A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. **PloS one**, 8: e66213.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. *Edipucrs*.
- Rosen, D. E. 1972. Origin of the characid fish genus *Bramocharax* and a description of a second, more primitive, species in Guatemala. **American Museum Novitates**, 500: 1-21.
- Rossini, B. C. 2015. Estudo da diversidade e das relações filogenéticas do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) baseado em sequências de DNA. Botucatu, São Paulo. **Tese de doutorado** 117p.
- Schloss, P. D., Handelsman, J. 2006. Toward a census of bacteria in soil. **PLoS Comput Biol**, 2: 786-793
- Shibatta, A. O., Orsi, M. L., Bennemann, S. T., Silva-Souza, A. T. 2002. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi, p. 403-423. Em: Medri, M. E., Bianchini, E., Shibatta, O. A., Pimenta, J. A. (Eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, UEL, 595p.
- Tang C.Q., Leasi F., Obertegger U., Kieneke A., Barraclough T.G., Fontaneto D. 2012. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 109: 16208-16212.
- Templeton, A. 1989. The meaning of species and speciation: a population genetics approach. In: Otte, D., Endler, J., (editors). **Speciation and its consequences**. Sunderland (MA): Sinauer Associates
- Vari, R. P., Castro, R. M. C. 2007. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. **Copeia** 2007: 150-162.
- Veregue, A. M. L., Orsi, M. L. 2003. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, 20: 97-105.
- Ward, R. D., Hanner, R., Hebert, P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes. **Journal of fish biology**, 74: 329-56.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 1847-1857.

Weitzman, S. H., Malabarba, L. R. 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). Pp. 161-170. IN: L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Edipucrs.

Yang, Z., Rannala, B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 107:9264–9269.

Zanata, Angela M.; Camelier, Priscila. 2009. *Astyanax vermilion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7:175-184.

Zanata, A. M., Camelier, P. 2008. Two new species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) from upper rio Paraguaçu and rio Itapicuru basins, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, 1908:28-40.

Capítulo II

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico “*Biological Journal of the Linnean Society*”

Species diversity of the “*Astyanax scabripinnis* complex” (Characiformes, Characidae) in the Tibagi river basin and adjacent basins, Paraná, Brazil

ABSTRACT

In this study, the aim was to define if individuals belonging to the “*A. scabripinnis* complex” found at Tibagi river basin and seven adjacent basins actually correspond to more than one species. Thus, the samples were separated into six groups according to external morphology: *Astyanax bockmanni*, *Astyanax paranae*, *Astyanax* sp.1, *Astyanax* sp.2, *Astyanax* sp.3 and *Astyanax serratus*. Based on these groups, a geometric morphology analysis was performed, through multivariate analysis of canonical variants (MANOVA/CVA) in attempt to identify the variations in morphology of those different groups. For molecular analyses, the method of mitochondrial gene (Cytochrome oxidase I) amplification was used, and from the sequences obtained, analyses of genetic distances and species delimitation following GMYC model, were performed. The multivariate analysis (Manova/Cva) indicated morphological differences between some groups (Wilk’s lambda = 0,02256, $df_1=160$, $F=13,57$, $p<0,0001$), with axis 1 explaining 64,35% and axis 2 explaining 20,60%. *Astyanax bockmanni* and *Astyanax* sp.2 were totally separated, while *Astyanax paranae* and *Astyanax* sp. 1 presented very small morphological differences, although distinct from the other two forms. The results of genetic distance showed a significant distance between *Astyanax paranae* and the others groups to the complex, whereas *Astyanax bockmanni* presented a significant similarity with *Astyanax* sp.1 and *Astyanax* sp.2 with 0.4164% and 0.9744% of distance, respectively. In contrast, the results from GMYC pointed out to an existence of tree species from the “*A. scabripinnis* complex” for the sampled area, grouping *Astyanax bockmanni* with *Astyanax* sp.1 in a same cluster. Therefore, combining the morphological with molecular results, we defined that *Astyanax paranae* is widely distributed at the Tibagi river and adjacent areas; beyond *Astyanax bockmanni* belongs to the “*A. scabripinnis* complex”; and we evidenced the need of description of two new species for the group. These results shows the importance of utilization of integrative tools, aiding studies of fishes identification mainly in complex groups as “*A. scabripinnis* species complex”.

Key words: Multivariate morphometrical analysis, species complex, DNA barcoding, GMYC, integrative taxonomy.

2.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Astyanax* foi proposto por Baird & Girard (1854), e é definido por uma combinação de caracteres, dos quais se destacam: duas fileiras de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna, linha lateral completa, nadadeira adiposa presente e nadadeira caudal sem revestimento de escamas (Eigenmann, 1917; 1927), possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América do Sul, Central e sul da América do Norte (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Lima *et al.*, 2003) e conta atualmente com 141 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2016). Porém, de acordo com diversos autores, o gênero *Astyanax* não forma um grupo monofilético (Rosen, 1972; Weitzman & Malabarba, 1998; Calcagnotto *et al.*, 2005; Vari & Castro, 2007; Mirande, 2010; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011) sendo indicado como gênero “*Incertae Sedis*” em Characidae (Lima *et al.*, 2003).

Jenyns (1842) descreveu uma espécie com o nome de *Tetragonopterus scabripinnis*, agora denominada *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921) utilizando um indivíduo coletado por Charles Darwin na cidade do Rio de Janeiro, no ano de 1832, durante sua expedição realizada no Brasil. Recentemente, a espécie teve a localidade-tipo determinada como a cidade do Rio de Janeiro, onde é considerada extinta (Lima *et al.*, 2007).

Na publicação de 1927, Eigenmann reconheceu cinco subespécies de *Astyanax scabripinnis*. Posteriormente, Moreira-Filho & Bertollo (1991) sugeriram, com base em caracteres morfológicos e cromossômicos, a existência do “complexo *A. scabripinnis*”, composto por 12 espécies. Bertaco & Malabarba (2001) e Bertaco & Lucena (2006) revisaram as espécies do complexo e descreveram mais quatro espécies, além de definirem as características morfológicas desse complexo. Os caracteres diagnósticos do complexo, de acordo com Bertaco & Lucena (2006) são os mesmos utilizados para reconhecer *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1921), corpo mais profundo e robusto próximo ao meio das nadadeiras peitorais, cabeça robusta, focinho curto (menor que o diâmetro orbital) de perfil abrupto, profundidade corporal menor do que 41% do

comprimento padrão, número reduzido de raios ramificados da nadadeira anal (13-21, sendo mais comum entre 17 a 18 e raramente 22 a 23 raios), presença de uma ou duas manchas umerais, e uma linha escura no meio do corpo que se estende até a ponta dos raios médios da nadadeira caudal. De acordo com esses caracteres, atualmente encontram-se descritas 25 espécies para o “complexo *A. scabripinnis*” As espécies do complexo apresentam ainda, a peculiaridade de serem encontradas em pequenos riachos com corredeiras, limitando-se às regiões de cabeceiras (Gomes & Azevedo, 1960; Britski, 1972).

Exemplares de *Astyanax* pertencentes ao “complexo *A. scabripinnis*” são comumente coletados ao longo da bacia do rio Tibagi, e têm sido identificados como *Astyanax paranae*, seguindo Eigenmann (1914) que define a espécie pelo número de raios da nadadeira anal, escamas do pedúnculo caudal e altura do corpo. Esse autor descreveu a espécie inicialmente como uma subespécie de *Astyanax scabripinnis*, utilizando indivíduos de diferentes bacias e definindo a localidade-tipo de maneira imprecisa, apenas como “Paraná”. Porém, Garutti & Britski (2000) analisando os exemplares da série típica que atualmente encontram-se depositados nas coleções da *California Academy of Sciences* (holótipo: CAS 22555, parátipos: CAS 22556) e observaram as etiquetas originais do Museu Paulista e também documentos do antigo Museu Paulista e da Seção de Peixes do MZUSP, e determinaram a localidade-tipo da espécie como a cidade de Castro, no Paraná, bacia do rio Tibagi. No entanto, os caracteres morfológicos que definem a espécie possuem uma grande amplitude de variação, talvez devido ao fato de terem sido utilizados exemplares de diferentes bacias na série tipo, como por exemplo, as bacias do rio Paranaíba e Iguaçu, o que ampliaria a variância nos caracteres. Assim, esses caracteres têm se mostrado ineficientes para diferenciar a espécie de outros morfótipos coletados na bacia do rio Tibagi, permitindo a inclusão de espécies morfológicamente similares nessa diagnose.

Um outro congênere, *Astyanax bockmanni* Vari & Castro, 2007 descrito para o rio Paranaíba demonstrou uma baixa divergência genética interespecífica com espécies do “complexo *A.*

scabripinnis” (*Astyanax intermedius*, *Astyanax rivularis*, *Astyanax paranae* e *Astyanax scabripinnis*) (Rossini, 2015), o que sugere que mesmo essa espécie não possuindo todas as características morfológicas que definem o “complexo *A. scabripinnis*”, pode fazer parte desse complexo pela semelhança genética com seus membros. Isso evidencia a necessidade de uma revisão das espécies do grupo e a definição da espécie *A. paranae*, buscando caracteres que permitam separá-la efetivamente de outras espécies do complexo.

Para a bacia do rio Tibagi, Shibatta *et al.* (2002) registraram a ocorrência de *A. paranae* entre as poucas que ocorreram exclusivamente em riachos das regiões média e baixa. Veregue & Orsi (2003) observaram a preferência da espécie por rios de menor porte em áreas de cabeceira que apresentam águas correntes entre remansos, como apontado anteriormente para *A. scabripinnis*.

A bacia do rio Tibagi percorre três formações geológicas distintas, o primeiro, o segundo e o terceiro planaltos paranaenses (França, 2002). Essa variação na formação geomorfológica da bacia pode interferir diretamente na distribuição das espécies, podendo causar isolamento geográfico e consequentemente reprodutivo dessa espécie que prefere ambientes de cabeceiras, levando à estruturação genética, o que ocasionalmente pode incorrer em um processo de especiação.

Nesse contexto, para identificar as diferenças na forma apresentada pelos diferentes morfótipos, a utilização de uma metodologia denominada morfometria geométrica, onde se considera forma “todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação” nos organismos (Bookstein, 1989) pode ser utilizada e apresentar resultados bastante informativos.

Análises de morfometria geométrica em peixes tem sido muito utilizadas em trabalhos recentes para determinar diferenças em suas formas, fornecendo informações morfológicas e auxiliando na identificação de novas espécies (Berbel-Filho, 2016; Geiger *et al.*, 2016). A partir desse tipo de análise, e também de análises citogenéticas e moleculares, Castro *et al.* (2014) encontraram diferenças significativas entre quatro populações do “complexo *A. scabripinnis*”,

permitindo concluir que essas populações estavam em processo de especiação. Deste modo, a aplicação dessa metodologia nas espécies do “complexo *A. scabripinnis*” aqui estudadas, pode ser de grande ajuda para sua compreensão.

No contexto de identificação de espécies, técnicas moleculares baseadas em DNA têm se destacado no auxílio à resolução de problemas taxonômicos. Em especial, uma metodologia descrita por Herbert *et al.* (2003) denominada DNA *barcoding*, tem demonstrado resultados satisfatórios na discriminação de várias espécies animais (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005), até mesmo frente à uma fauna megadiversa como no caso dos peixes no Brasil (Pereira *et al.*, 2013).

Essa metodologia busca utilizar sequências de um trecho do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) com pouca ou nenhuma variação em uma espécie para estimar a distância genética entre os organismos. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência dessa metodologia na discriminação da diversidade da ictiofauna tanto na região neotropical, quanto em outras regiões zoogeográficas (Ward *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Frantine-Silva *et al.*, 2015).

A partir de dados de um único loco, como é o caso do DNA *barcoding* é possível realizar também uma análise de delimitação de espécies, cuja mais utilizada é baseada no modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*), criado por Pons *et al.*, 2006 e Fontaneto *et al.*, 2007, que delimita as espécies considerando que elas evoluem de forma independente, o que leva ao aparecimento de agrupamentos genéticos distintos que se separam por longos ramos nas árvores (Barraclough *et al.*, 2003; Acinas *et al.*, 2004). Análises com o modelo GMYC são bastante frequentes para avaliar a biodiversidade e filogenia de comunidades ecológicas (Pons *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2013).

O método de delimitação de espécies baseado no modelo GMYC tem sido aplicado em trabalhos moleculares que analisam um único loco em diversos organismos (Fontaneto *et al.*, 2007; Lahaye *et al.*, 2008; Papadopoulou *et al.*, 2008), inclusive em grupos complexos de peixes (Costa-

Silva *et.al*, 2015), e demonstrado bastante eficiência, uma vez que análises a partir do modelo GMYC, são muito eficientes na identificação de espécies, até mesmo em grupos hiperdiversos (Ratnasingham & Herbert, 2013) como é o caso de *Astyanax*.

Considerando a variação morfológica apresentada pelos exemplares do “complexo *A. scabripinnis*” da bacia do rio Tibagi, o presente estudo visa determinar se os exemplares coletados nos diferentes locais ao longo da bacia do rio Tibagi e áreas adjacentes compreendem a mais de uma espécie.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de amostragem

A bacia do rio Tibagi está localizada entre as coordenadas geográficas 22°47'22” e 25°36'25” de latitude sul, e 049°36'00” e 051°27'36” de longitude oeste, com uma área de drenagem de 24.712 km² é o principal afluente da margem esquerda do rio Paranapanema, importante afluente do rio Paraná. Limita-se ao norte com a bacia do rio Paranapanema; a leste com as bacias dos rios das Cinzas e Itararé; a sudeste com a bacia do rio Ribeira; ao sul com a bacia do rio Iguaçu; a oeste com a bacia do rio Ivaí; e a noroeste com a bacia do rio Pirapó (França, 2002).

2.2.2 Amostragem

No total, foram realizadas amostragens em 77 pontos localizados em cabeceiras de riachos do rio Tibagi e de suas sete bacias adjacentes. Desse total, 33 pontos localizam-se no rio Tibagi, sendo 24 nas regiões limítrofes do rio Tibagi com as bacias adjacentes, quatro em regiões conhecidas para espécies de interesse e cinco pontos em riachos do município de Castro, Paraná, município determinado como localidade-tipo para *Astyanax paranae*. Para as demais bacias, as amostragens se deram em suas extremidades, nas proximidades de suas divisas com a bacia do rio Tibagi, e tiveram a seguinte proporção: 7 pontos no rio Paranapanema, 8 pontos no rio das Cinzas, 3

pontos no rio Iguaçu, 11 pontos no rio Ivaí , 6 pontos no rio Itararé e 9 no rio Pirapó (Figura 1). As amostragens foram realizadas no período de dezembro de 2012 a abril de 2015, sob a autorização de coleta número: SISBIO12120-1, 09/16/2007.

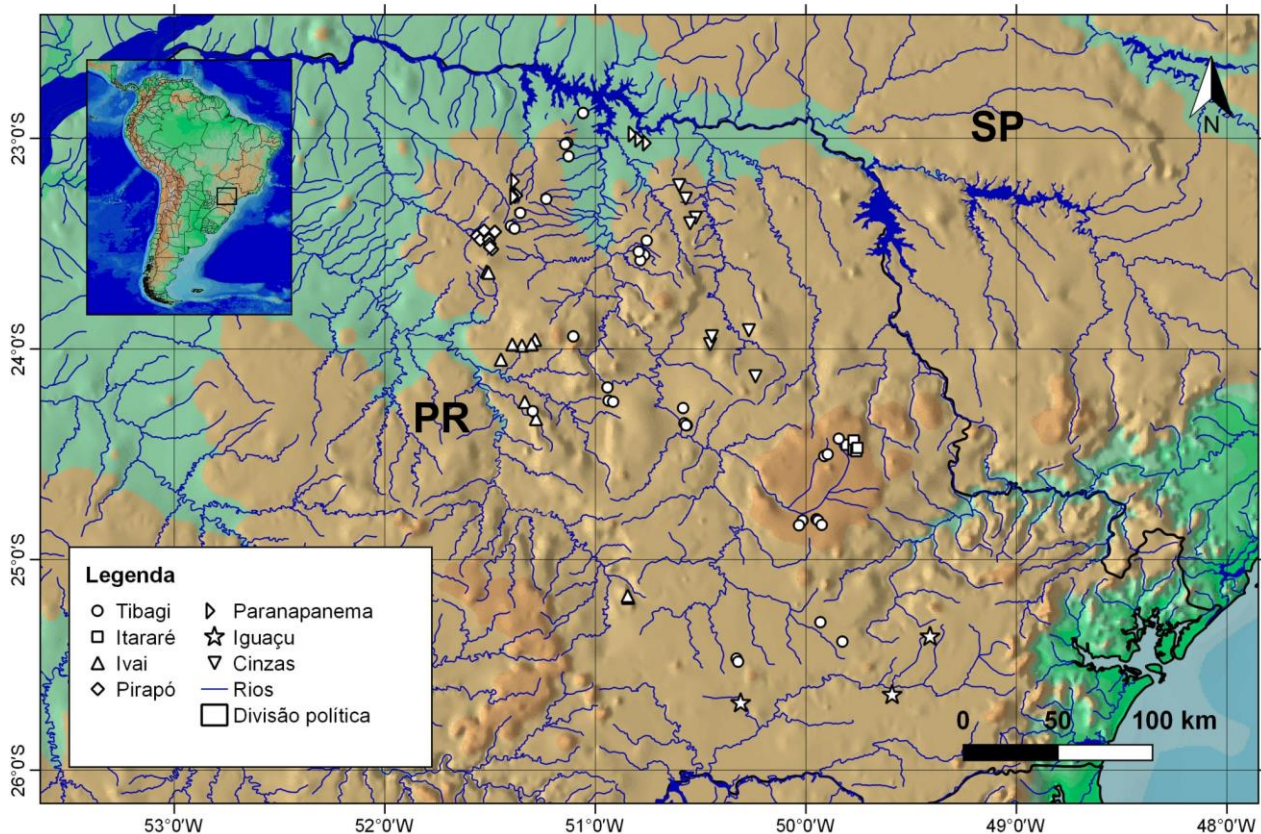


Figura 1. Disposição dos pontos amostrais nas sete bacias hidrográficas estudadas. Diferentes formas representam as bacias hidrográficas.

Em cada ponto amostral, a coleta dos peixes foi realizada com o uso de peneiras e redes de arrasto com um esforço de coleta de 60 minutos. Após coletados, os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (Eugenol 10%) e mortos por superexposição a esse anestésico (Lucena *et al.*, 2013). Os peixes foram então identificados e alguns exemplares de cada grupo para cada ponto foram preservados em álcool absoluto e posteriormente mantidos refrigerados para as análises moleculares, e o restante dos exemplares foi fixado em formalina a 10% e catalogados e

depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL). A lista dos exemplares catalogados é apresentada no Apêndice 1.

2.2.3 Morfometria geométrica

Para as análises morfométricas foram utilizados um total de 386 indivíduos da bacia do rio Tibagi, bacia onde se encontra a localidade-tipo de *Astyanax paranae*, separados *a priori* em quatro grupos: *Astyanax bockmanni* seguindo diagnose da espécie (Vari & Castro, 2007) (66 indivíduos) e *Astyanax* sp.1 (14 indivíduos), *Astyanax paranae* (261 indivíduos), *Astyanax* sp.2 (45 indivíduos), que encontram-se dentro da diagnose de *Astyanax paranae* (Eigenmann, 1914). Também foram analisadas duas espécies do rio Iguaçu, *Astyanax serratus* Garavello & Sampaio (2010) (17 indivíduos), e *Astyanax* sp.3 (Figura 2 “E”, com 14 indivíduos), que embora não compartilhem caracteres diagnósticos com as espécies dos grupos estudados, ocorrem na mesma área de indivíduos que foram utilizados para a descrição de *Astyanax paranae*, podendo ser informativos sobre a real identificação dessas espécies

A identificação dos grupos seguiu os seguintes critérios:

1) *Astyanax bockmanni*: perfil dorsal convexo, levemente côncavo acima dos olhos; altura do corpo contida 2,4 a 2,7 vezes no CP; mancha umeral anterior castanho escura, alongada verticalmente, triangular, com a região superior mais larga; mancha umeral posterior difusa, ligeiramente arredondada; 22 ou 23 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal côncavo dorsalmente e ventralmente. Nadadeira anal avermelhada em vida (Figura 2 “A”).

2) *Astyanax* sp.1: perfil dorsal convexo, ligeiramente côncavo acima dos olhos; altura do corpo contida 2,8 a 2,9 vezes no CP; mancha umeral anterior castanho escura, alongada verticalmente, triangular, com a região superior mais larga; mancha umeral posterior inconspícua; 17 a 23 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal côncavo dorsalmente e ventralmente. Nadadeira anal avermelhada em vida (Figura 2 “B”).

3) *Astyanax paranae*: perfil dorsal convexo, inclinado para cima e aproximadamente reto da ponta do focinho até a ponta do processo supraoccipital; altura do corpo contida 3,1 a 3,3 vezes no CP, mancha umeral anterior castanho escura, alongada verticalmente, triangular, com a região superior mais larga; mancha umeral posterior difusa, ligeiramente arredondada; 17 a 23 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal côncavo dorsalmente e ventralmente. Nadadeira anal avermelhada em vida (Figura 2 “C”).

4) *Astyanax* sp.2: Perfil dorsal ligeiramente convexo, inclinado para cima e aproximadamente reto da ponta do focinho até a ponta do processo supraoccipital; altura do corpo contida 3,4 a 3,6 vezes no CP; mancha umeral anterior castanho escura, alongada verticalmente, triangular, mais larga superiormente; mancha umeral posterior difusa, ligeiramente arredondada; 17 a 19 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal quase reto dorsalmente e ventralmente (Figura 2 “D”).

5) *Astyanax* sp.3: Perfil dorsal convexo, inclinado para cima e aproximadamente reto da ponta do focinho até a base do processo supraoccipital; altura do corpo contida 2,6 a 2,8 vezes no CP; mancha umeral anterior difusa, aproximadamente arredondada; 20 a 23 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal côncavo dorsalmente e ventralmente (Figura 2 “E”).

6) *Astyanax serratus*: perfil dorsal convexo, levemente côncavo acima dos olhos; altura do corpo contida 2,6 a 3,1 vezes no CP; mancha umeral anterior negra, alongada horizontalmente; 16 a 20 raios totais na nadadeira anal; perfil do pedúnculo caudal côncavo dorsalmente e ventralmente. Nadadeira anal amarelada em vida (Figura 2 “F”).

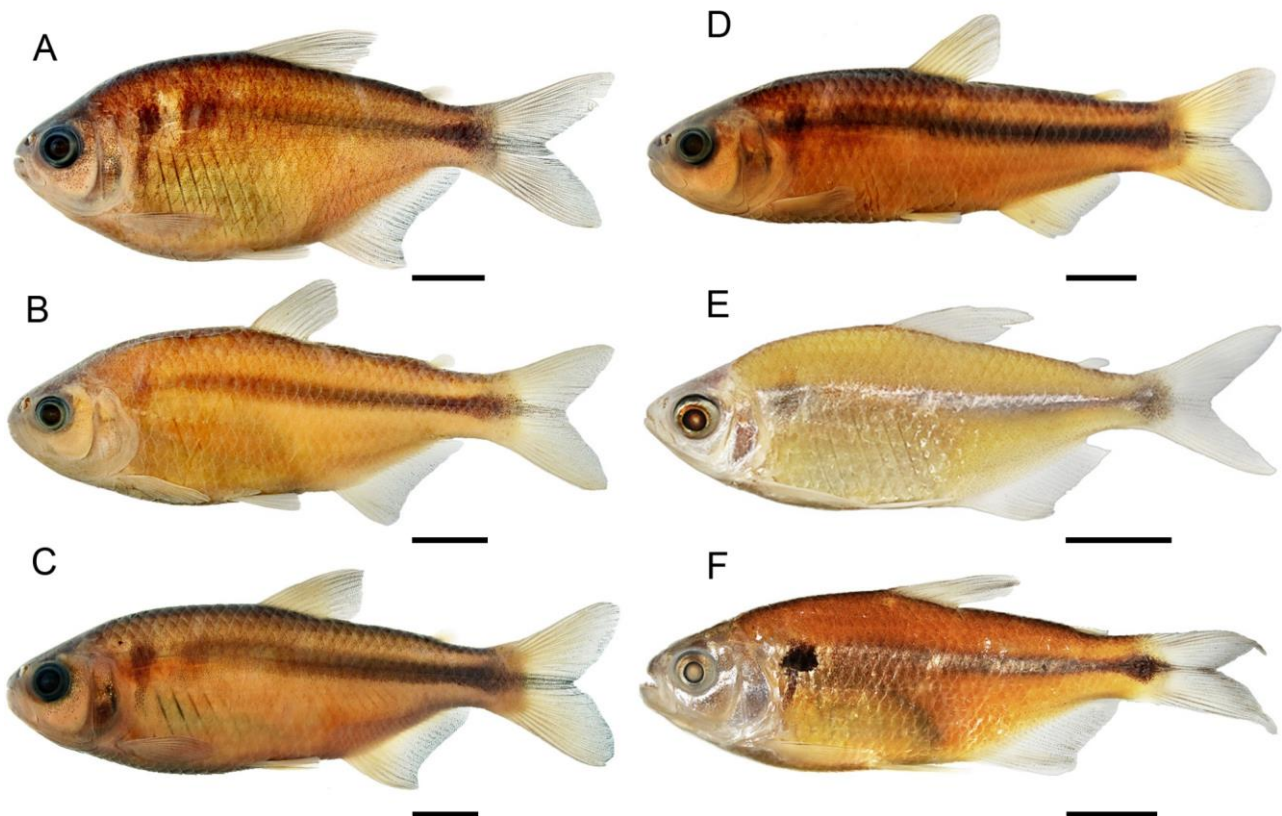


Figura 2. Exemplos representativos dos quatro grupos definidos para a realização das análises morfométricas. A: *Astyanax bockmanni* (MZUEL 14372, 65,91 mm), B: *Astyanax* sp.1 (MZUEL13486, 62,75 mm), C: *Astyanax paranae* (MZUEL14399, 77,15 mm), D: *Astyanax* sp.2 (MZUEL11051, 73,97 mm), E: *Astyanax* sp.3 (MZUEL14416, 46,85 mm) e F: *Astyanax serratus* (MZUEL14418, 57,13 mm).

Foram obtidas imagens de cada indivíduo utilizando uma câmera digital com resolução de 12 megapixels e com uma distância focal entre a câmera e os indivíduos padrão de 25 cm sem utilização de efeitos de *zoom*. Foi utilizado o software TpsUtil64 v.1.46 (Rohlf, 2010b) para agrupar as imagens dos grupos e converter os arquivos para uma extensão necessária para realização das análises (extensão de arquivo *.tps). Dezesesseis marcos anatômicos foram selecionados ao longo do corpo dos indivíduos, de modo a representar a sua forma geral (Figura 3): 1: extremidade posterior do osso supra-occipital, 2: inserção anterior da nadadeira dorsal, 3: inserção posterior da nadadeira dorsal, 4: inserção anterior da nadadeira adiposa, 5: inserção posterior da nadadeira adiposa, 6: parte dorsal do pedúnculo caudal, 7: parte ventral do pedúnculo caudal, 8: inserção posterior da nadadeira anal, 9: inserção anterior da nadadeira anal, 10: istmo, 11: ponta do focinho, 12: região posterior da

pré-maxila, 13: margem anterior do olho, 14: margem posterior do olho, 15: inserção superior do opérculo, 16: inserção da nadadeira peitoral. O software tpsDig64 v.2.16 (ROHLF, 2010a), foi utilizado para digitalizar os marcos anatômicos (*landmarks*).

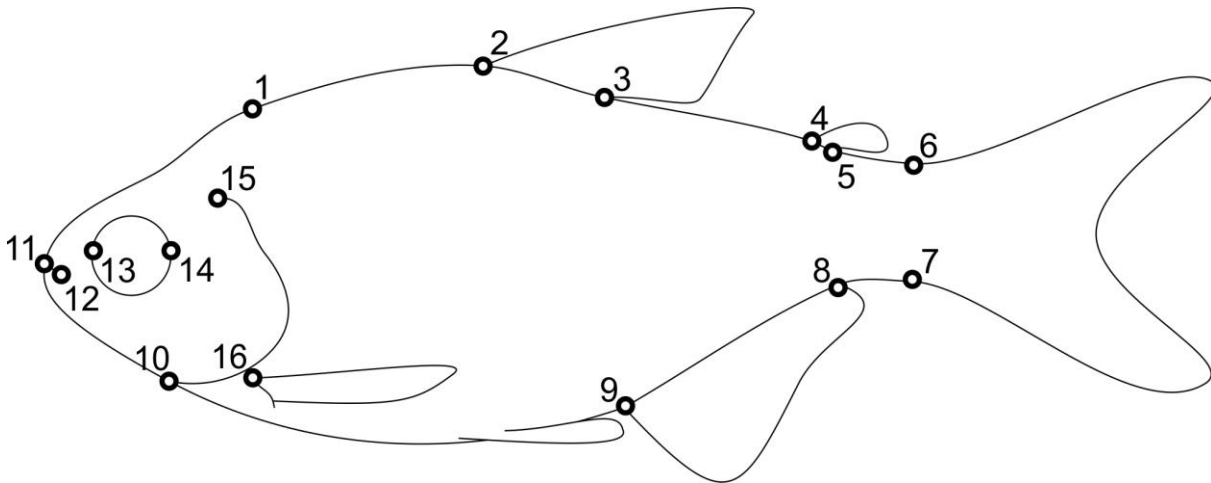


Figura 3. Marcos anatômicos selecionados ao longo do corpo dos indivíduos. 1: extremidade posterior do osso supra-occipital, 2: inserção anterior da nadadeira dorsal, 3: inserção posterior da nadadeira dorsal, 4: inserção anterior da nadadeira adiposa, 5: inserção posterior da nadadeira adiposa, 6: parte dorsal do pedúnculo caudal, 7: parte ventral do pedúnculo caudal, 8: inserção posterior da nadadeira anal, 9: inserção anterior da nadadeira anal, 10: istmo, 11: ponta do focinho, 12: região posterior da pré-maxila, 13: margem anterior do olho, 14: margem posterior do olho, 15: inserção superior do opérculo, 16: inserção da nadadeira peitoral.

Após a marcação dos *landmarks*, foi realizado o alinhamento de *Procrustes*, para que fossem eliminadas as variações na posição, escala e orientação dos *landmarks* obtidos a partir das imagens (Klingenberg, 2002), de modo que todos os indivíduos do mesmo grupo são sobrepostos, ajustando e centralizando cada configuração entre cada ponto homólogo, gerando assim uma configuração de referência.

Com os *landmarks* alinhados, as diferenças na forma do corpo entre os quatro grupos foram determinadas utilizando a análise das variáveis canônicas associada a análise de variância multivariada (MANOVA/CVA; Klingenberg, 2002) observando-se a dispersão dos *landmarks* de cada grupo e a dispersão dos escores individuais no espaço do primeiro e do segundo eixo canônico.

Também foi construída uma árvore de distância Euclidiana pelo método UPGMA para representar a distância linear entre os *clusters* gerada pela MANOVA/CVA.

Após o alinhamento, o software tpsrelw64 v.1.60 (Rohlf, 2003) foi utilizado para criar uma configuração consenso de *landmarks* para cada um dos grupos. Todas as análises morfométricas multivariadas foram realizadas no software Past v.2.10 (Hammer *et al.*, 2004).

2.2.4 Análises moleculares

2.2.4.1 Extração, amplificação e sequenciamento

Para as análises moleculares, foram utilizados no total, 90 indivíduos oriundos de seis das sete bacias onde foram realizadas as amostragens (24 do rio Tibagi, 12 do rio Paranapanema, 5 do rio das Cinzas, 16 do rio Iguaçu, 18 do rio Ivaí e 15 do rio Pirapó), sendo 3 indivíduos do grupo denominado *Astyanax bockmanni*, 39 do grupo *Astyanax paranae* (9 de riachos do município de Castro, Paraná), 24 do grupo *Astyanax* sp.1, 8 do grupo *Astyanax* sp.2, 12 do grupo *Astyanax serratus* e 4 do grupo aqui identificado como *Astyanax* sp.3.

Todos os indivíduos tiveram o DNA total extraído conforme o protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). As amplificações do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI, 648pb) foram realizadas utilizando os *primers* FishF1 e FishR1 descritos por Ward *et al.* (2005) com base no protocolo descrito por Pereira *et al.* (2013). Os produtos resultantes da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (2 μ L de amostra/2 μ L ficoll+azul de bromofenol), corados com 0,08 μ L/mL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies). Após visualização, o restante do produto amplificado foi purificado com adição de 0,5 μ L de ExoStar™ 1-Step (Illustra™). As amostras foram então sequenciadas bidirecionalmente em reações independentes, de acordo com o protocolo descrito por Hajibabaei *et al.* (2005). O produto das reações de sequenciamento foi analisado em sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems Inc., CA, USA).

2.2.4.2 Qualidade das sequências e Análises de distância genética

O software Eletropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido, 2003) foi utilizado para produção de sequências consenso para cada indivíduo a partir das sequências *forward* e *reverse*. Posteriormente, essas sequências foram alinhadas e editadas manualmente no software MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). O mesmo software foi utilizado para construção de uma árvore de Neighbor-Joining (NJ) e para calcular as distâncias genéticas intra e interespecíficas a partir do modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P - Kimura, 1980).

2.2.4.3 Análises filogenéticas e Delimitação das espécies

As análises de inferência Bayesiana (IB) foram realizadas com o auxílio do programa BEAST v.2.1.3 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond & Rambaut, 2015), com taxa de mutação referência de 0.01 mutação a cada milhão de anos, com relógio estrito, que considera que as taxas de evolução molecular são iguais em diferentes ramos, empregado ainda o método de coalescência (Heled & Drummond, 2010) com o modelo Yule. Os dados foram analisados como uma única partição e o modelo evolutivo utilizado foi GTR + G, especificado previamente pelo programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). As análises foram executadas por 100 milhões de gerações amostrando-se uma árvore a cada 10000 gerações. O programa TRACER v. 1.5 (pacote BEAST) foi usado para verificar a probabilidade posterior do tamanho efetivo mínimo suficiente (ESS > 200) e estimativa significativa dos parâmetros e as médias de idades dos nós, considerando um *burn-in* de 25 milhões de gerações. As árvores foram sumarizadas e visualizadas usando os programas TREEANNOTATOR 1.5.3 e FIGTREE 1.3.1, respectivamente (Drummond & Rambaut, 2007).

A partir dos resultados da análise filogenética, foi realizado o teste de delimitação de espécies utilizando o modelo *Generalized Mixed Yule - Coalescent* (GMYC; Pons *et al.*, 2006), mais adequado para dados com um gene. Utilizou-se o pacote “Species Limits by Threshold

Statistics” (Splits; Pons *et al.*, 2006), implementado no programa R v3.0.1 (R Core Team 2013) a partir da árvore ultramétrica previamente gerada no BEAST. Por meio desse pacote é possível calcular o número de *clusters*, classificando as taxas de bifurcação de um filograma como resultantes de processos de ramificações interespecíficas ou intra-específicas das linhagens (Pons *et al.*, 2006).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Morfometria geométrica

A análise multivariada (MANOVA/CVA) realizada a partir dos *landmarks* individuais para cada grupo indicou diferenças morfométricas entre alguns desses grupos (lambda de Wilks = 0,02256, $df1=160$, $F=13,57$, $p<0,0001$) com o Eixo 1 explicando 64,35% e Eixo 2 explicando 20,60% da variação entre os grupos.

A análise MANOVA/CVA separou completamente três grupos no primeiro eixo, com o grupo *Astyanax bockmanni* (pontuação negativa) e *Astyanax* sp.2 (pontuação positiva) dispostos nos extremos. No mesmo eixo os indivíduos dos grupos *Astyanax paranae*, *Astyanax* sp.1, *Astyanax serratus* e *Astyanax* sp.3 tiveram seus escores sobrepostos, embora tenham se diferenciado dos outros dois grupos. Já para o eixo canônico 2, os grupos se sobrepõem amplamente, o que demonstra não possuírem uma grande variação para esse eixo (Figura 4).

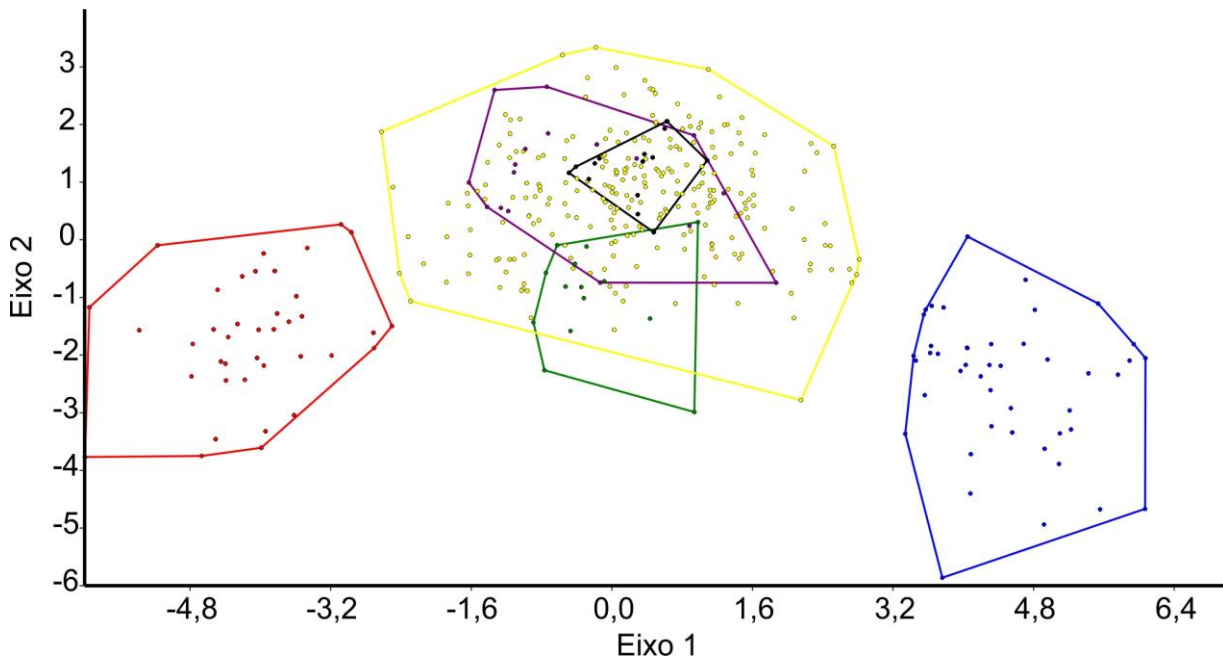


Figura 4. Dispersão dos escores individuais no espaço do primeiro e segundo eixos canônicos das amostras combinadas de *Astyanax bockmanni* (círculos vermelhos), *Astyanax paranae* (círculos amarelos), *Astyanax* sp.1 (círculos verdes), *Astyanax* sp.2 (círculos azuis), *Astyanax serratus* (círculos roxos) e *Astyanax* sp.3 (círculos pretos) das bacias dos rios Tibagi e das áreas adjacentes, estado do Paraná, Brasil.

A árvore das distâncias euclidianas obtidas pela análise MANOVA/CVA construída pelo método UPGMA, mostra que os grupos *Astyanax* sp.1, *Astyanax paranae*, *Astyanax* sp.3 e *Astyanax serratus* são os grupos com a menor distância do conjunto de dados, e que os mesmos possuem uma menor distância para *Astyanax bockmanni* do que quando comparadas com *Astyanax* sp.2, grupo mais distante dos demais, indicando uma maior diferença morfológica (Figura 5).

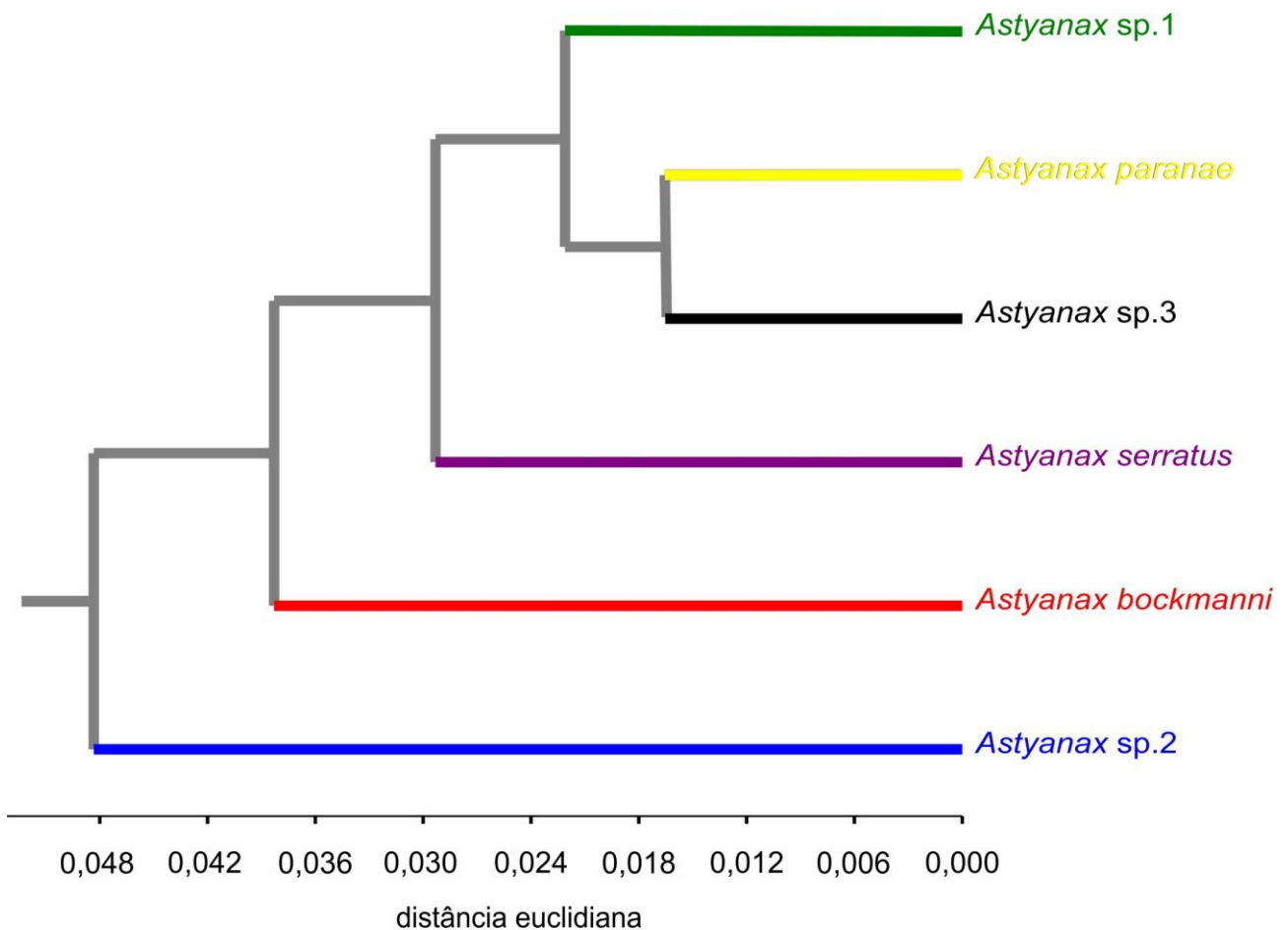


Figura 5. Árvore das distâncias Euclidianas dos centróides obtidas da MANOVA/CVA, construída pelo método UPGMA, das espécies do “complexo *Astyanax scabripinnis*”, *Astyanax* sp.3 e *Astyanax serratus* das bacias do rio Tibagi e áreas adjacentes.

O gráfico com a dispersão dos pontos (*landmarks*) após o alinhamento de *Procrustes* mostra que não houve excesso de variação ou *outliers* para nenhum dos grupos (Figura 6 “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”).

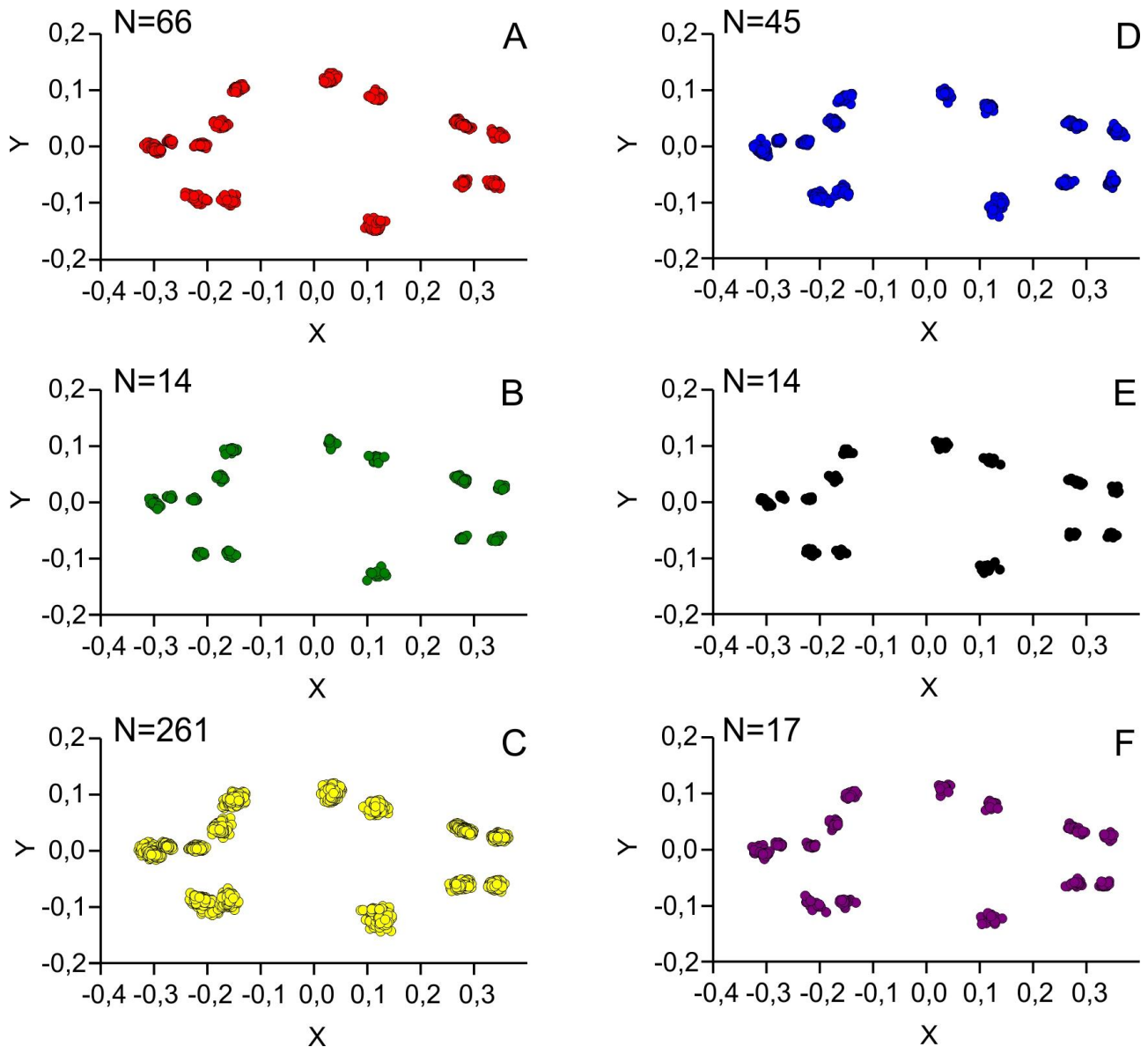


Figura 6. Gráficos de dispersão dos *landmarks* individuais para *Astyanax bockmanni* (A, círculos vermelhos), *Astyanax* sp.1 (B, círculos verdes), *Astyanax paranae* (C, círculos amarelos), *Astyanax* sp.2 (D, círculos azuis), *Astyanax* sp.3 (E, círculos pretos) e *Astyanax serratus* (F, círculos roxos) das bacias dos rios Tibagi e das áreas adjacentes, estado do Paraná, Brasil.

As formas consenso dos grupos construídas a partir da configuração consenso dos *landmarks* mostraram uma variação importante na morfologia dos diferentes grupos (Figura 7 “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”).

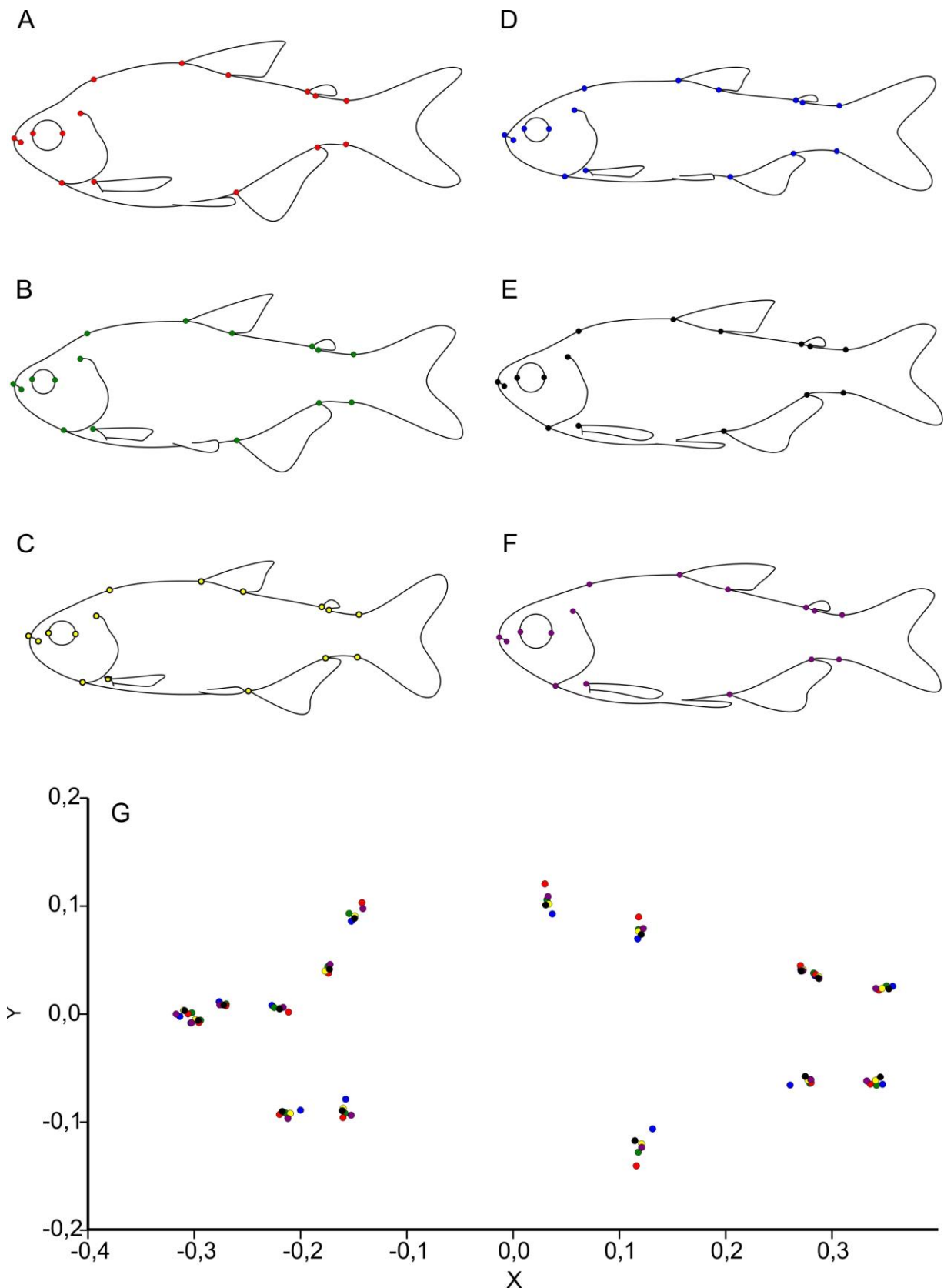


Figura 7. Forma consenso dos grupos do “complexo *Astyanax scabripinnis*” construída através da ligação dos pontos da formação consenso de *landmarks* de cada grupo (A-F) e sobreposição dos consensos alinhados dos seis grupos analisadas (G). *Astyanax bockmanni*: A, círculos vermelhos, *Astyanax sp.1*: B, círculos verdes, *Astyanax paranae*: C, círculos amarelos, *Astyanax sp.2*: D, círculos azuis, *Astyanax sp.3*: E, círculos pretos e *Astyanax serratus*: F, círculos roxos.

Dentre os indivíduos dos grupos pertencentes ao “complexo *A. scabripinnis*”, *Astyanax bockmanni* caracterizou-se com o corpo mais alto entre todas as espécies do grupo (Figura 7, “A”), a maioria dos seus *landmarks* localizados nas extremidades do corpo mostraram uma variação considerável quando comparados às formas consensos das demais espécies, sendo mais positivo ou mais negativo que os demais grupos em relação ao eixo “y” (Figura 7, “G”). Em relação ao eixo “x”, o grupo apresentou um valor menos negativo que os demais grupos para o *landmark* 14, que representa a margem posterior do olho, o que demonstra um maior diâmetro do olho. Ainda com relação a esse eixo, o marco que representa a extremidade posterior do osso supra-occipital (*landmark* 1) também demonstrou um valor menos negativo para o grupo, caracterizando essa estrutura da cabeça como mais alongada. Outra variação importante para o eixo ‘x’, foi em relação à inserção anterior da nadadeira anal (*landmark* 9), no qual *A. bockmanni* mostrou um valor menos positivo que os demais grupos para esse marco, o que mostra um maior comprimento da base da nadadeira anal (Figura 7, “G”).

O grupo *Astyanax* sp.1 caracterizou-se como o segundo consenso de corpo mais alto com relação aos grupos do “complexo *A. scabripinnis*” (Figura 7, “B”), tendo a maioria de seus marcos das extremidades do corpo mais positivos ou mais negativos em relação ao eixo “y” que os demais (Figura 7, “G”), com exceção de *A. bockmanni*. Para o eixo “x”, *Astyanax* sp.1 apresenta uma menor distância entre os marcos posicionados na margem anterior do olho e margem posterior do olho (*landmarks* 13 e 14), o que demonstra possuir um menor diâmetro do olho. Ainda para o mesmo eixo, o grupo mostra valores um pouco menos positivos para o marco da inserção anterior da nadadeira anal (*landmark* 9) em relação aos outros grupos, exceto *A. bockmanni*, possuindo então, o comprimento da base da nadadeira anal um pouco maior em relação aos outros dois grupos.

Astyanax paranae, apresentou-se com a terceira maior altura do corpo quando comparado com os outros membros do complexo (Figura 7, “C”), apresentando a maioria dos *landmarks* posicionados nas extremidades do corpo menos positivos ou menos negativos para o eixo “y” em

relação aos grupos já citadas acima. Para o eixo “x” não houve grandes variações exclusivas para este grupo.

O grupo que apresentou o consenso dos marcos anatômicos com a menor altura do corpo de todos os grupos foi *Astyanax* sp.2 (Figura 7, “D”), o grupo possui a maioria dos *landmarks* da extremidade do corpo com valores menos positivos ou menos negativos para o eixo “y” do que todos os demais (Figura 7, “G”). Em relação ao eixo “x” o grupo apresenta o marco da inserção anterior da nadadeira dorsal (*landmark* 2) mais positivo que os demais grupos, o que demonstra uma nadadeira dorsal com a base mais curta de modo geral. Este grupo apresentou a variação mais acentuada para dois de seus marcos observada em todo o trabalho com relação ao eixo “x”, o *landmark* 8 tem o valor menos positivo dentre todos os grupos, enquanto que o *landmark* 9 possui o valor mais positivo no geral, demonstrando que o grupo em questão, possui a base da nadadeira anal mais curta em relação a todos os grupos analisados.

Quanto às espécies do rio Iguaçu, *Astyanax serratus* apresentou um corpo bastante alto (Figura 7, “E”), bem próximo à altura de *Astyanax bockmanni*. Em relação ao eixo “x”, *A. serratus* apresentou uma maior distância entre os *landmarks* 13 e 14, o que representa possuir um maior diâmetro do olho (Figura 7, “G”). Também com relação ao eixo “x”, o *landmark* 16 apresentou valores menos negativos para a espécie em questão (Figura 7, “G”), demonstrando uma inserção da nadadeira peitoral mais posterior do que os demais grupos.

Já a espécie *Astyanax* sp.3, demonstrou uma sobreposição total ou parcial da maioria de seus *landmarks* com os do grupo *Astyanax paranae* (Figura 7, “G”), evidenciando uma forma bastante parecida entre esses dois grupos (Figura 7, “E” e “C”). Apenas dois pontos diferiram significativamente, sendo eles os *landmarks* 9 e 10 (Figura 7, “G”), que representam a inserção anterior da nadadeira anal e o istmo respectivamente, evidenciando possuir um maior comprimento da nadadeira anal, assim como o início mais anterior do istmo.

2.3.2 Análises moleculares

2.3.2.1 Análises de distância genética

Foram obtidas sequências com 583 pb de 90 indivíduos. Não foram identificados códons de parada, deleções ou inserções de bases em nenhuma das sequências. As distâncias genéticas intraespecíficas encontradas para os grupos analisados foram: 0% para *Astyanax bockmanni* (n=03), 0,12% para *Astyanax* sp.1 (n=24), 0,58% para *Astyanax paranae* (n=39), 0,14% para *Astyanax* sp.2 (n=08), 0,08% para *Astyanax* sp.3 (n=04) e 0% para *Astyanax serratus* (n=12). As distâncias genéticas interespecíficas são demonstradas na tabela abaixo (Tabela 1) e representadas na árvore de Neighbor-Joining (Figura 8).

Tabela 1. Distâncias genéticas interespecíficas K2P entre os grupos analisados.

	Distância genética interespecífica (%)					
	A. sp.3	A. serratus	A. bockmanni	A. paranae	A. sp.1	A. sp.2
A. sp.3	—	—	—	—	—	—
A. serratus	3,1267	—	—	—	—	—
A. bockmanni	3,4964	3,3542	—	—	—	—
A. paranae	5,0232	5,5225	2,9541	—	—	—
A. sp.1	3,1920	3,4305	0,4164	2,6698	—	—
A. sp.2	3,4279	3,6518	0,9744	3,3083	1,0475	—

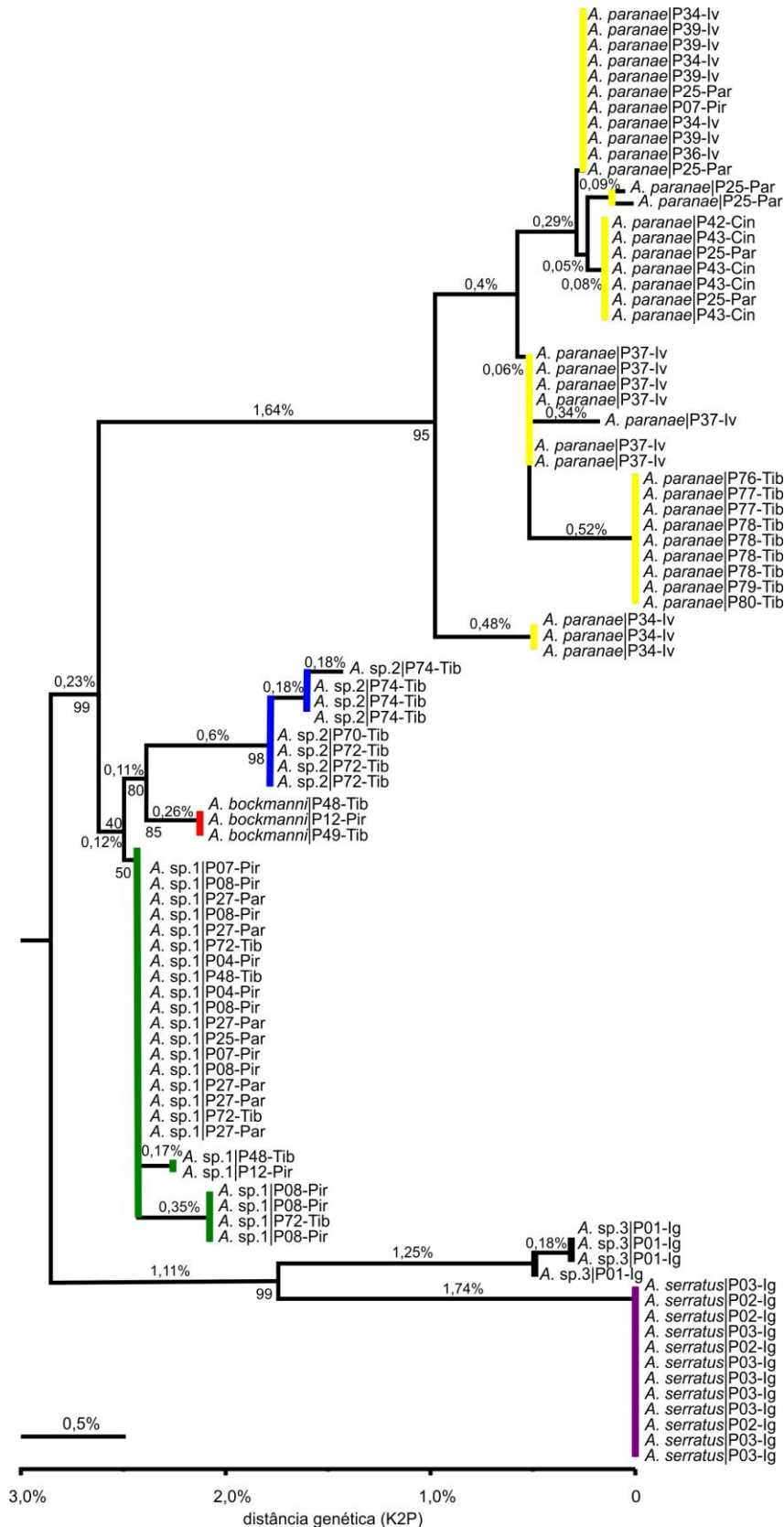


Figura 8. Árvore de Neighbor-Joining representando as distâncias genéticas interespecíficas a partir do modelo Kimura-2-Parâmetros dos indivíduos analisados. Os nomes dos táxons terminais indicam: nome do grupo; ponto amostral; e drenagem de origem (Tib: Tibagi, Par: Paranapanema, Cin: Cinzas, Ig: Iguçu, Iv: Ivaí e Pir: Pirapó). A escala indica a distância genética (%). Valores sobre os braços indicam distância do braço e valores próximos aos nós indicam a *bootstrap*.

2.3.2.2 Análises filogenéticas e Delimitação das espécies

Os resultados da análise GMYC mostram a formação de cinco *clusters*, sugerindo o reconhecimento de cinco espécies. Os cinco *clusters* apresentam a seguinte distribuição: *cluster 1* (espécimes do grupo *Astyanax bockmanni* e *Astyanax sp.1*); *cluster 2* (espécimes do grupo *Astyanax sp.2*); *cluster 3* (espécimes do grupo *Astyanax paranae*); *cluster 4* (espécimes do grupo *Astyanax sp.3*); e *cluster 5* (espécimes do grupo *Astyanax serratus*). Dentre os cinco *clusters* houve um caso no qual ocorreram espécimes de diferentes grupos dentro de um mesmo *cluster*, para o *cluster 1*, se agruparam os indivíduos do grupo nomeado *Astyanax bockmanni* e os indivíduos do grupo nomeado *Astyanax sp.1* (Figura 9).

O tempo de divergência para os grupos analisados apresentou um valor consideravelmente baixo, aproximadamente 2 milhões de anos, mostrando se tratar de um grupo extremamente recente (Figura 9).

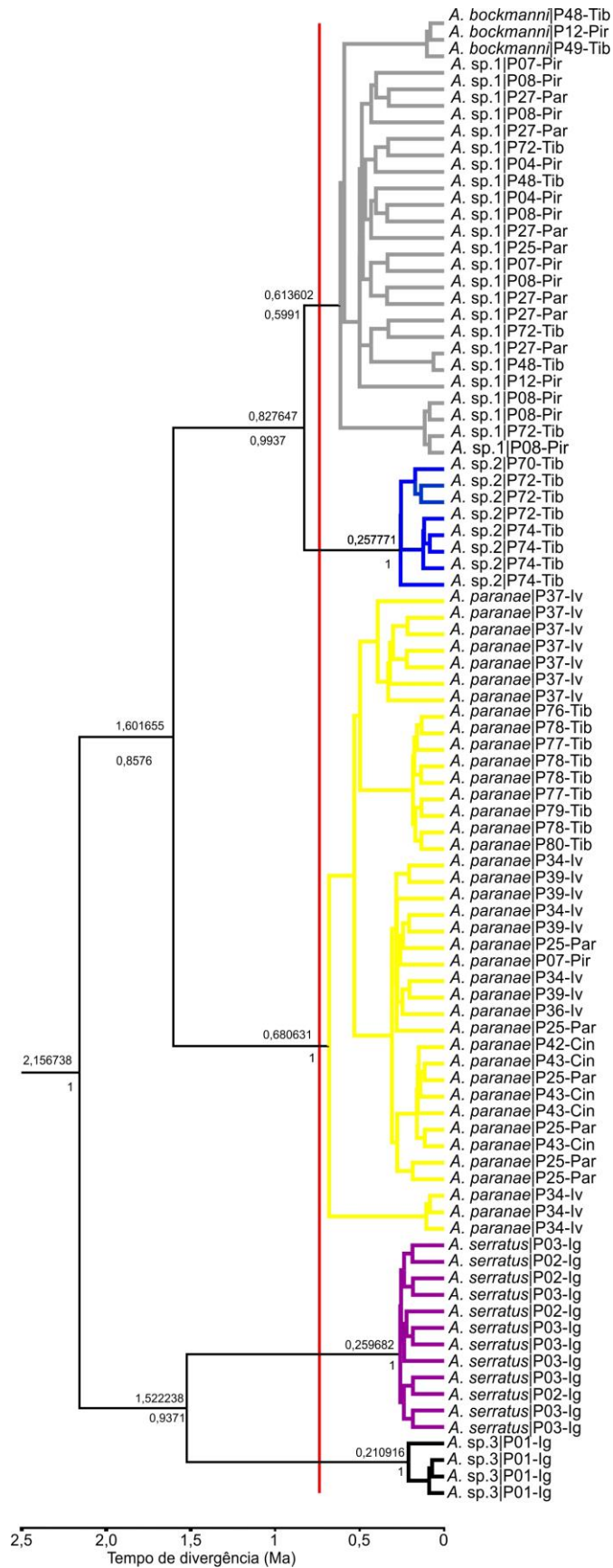


Figura 9. Árvore filogenética bayesiana construída a partir do BEAST, utilizando o modelo GMYC com *single-threshold*. A linha vermelha vertical mostra o ponto de transição do processo de ramificação a partir do modelo Yule de coalescência. Os nomes dos táxons terminais indicam: nome do grupo; ponto amostral; e drenagem de origem (Tib: Tibagi, Par: Paranapanema, Cin: Cinzas, Ig: Iguaçu, Iv: Ivaí e Pir: Pirapó). Valores próximos aos nós indicam: acima (tempo de divergência) e abaixo (probabilidade posterior).

2.3.3 Distribuição geográfica das amostras

Astyanax sp.2 apresentou a distribuição mais restrita entre os grupos pertencentes ao complexo de espécies, com ocorrência restrita ao médio rio Tibagi (Figura 10).

Já as amostras de *Astyanax bockmanni* são provenientes do norte do estado do Paraná, ocorrendo em riachos do rio Paranapanema, Pirapó e Tibagi, evidenciando uma distribuição ampla para essa região (Figura 10). Para o rio Tibagi, exemplares da sua porção média foram utilizados na descrição original.

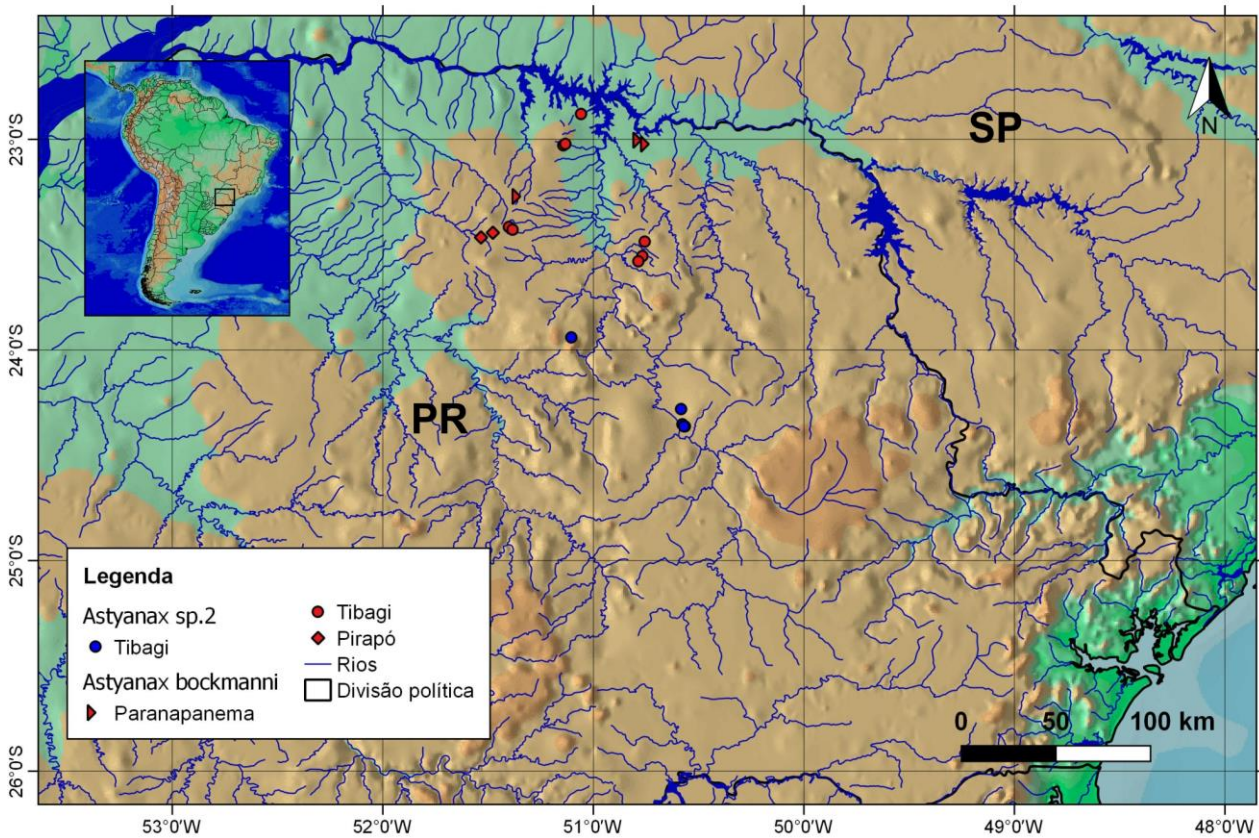


Figura 10. Área de distribuição das amostras de *Astyanax* sp.2 (pontos azuis) e *Astyanax bockmanni* (pontos vermelhos). Bacias hidrográficas representadas por diferentes símbolos.

Astyanax sp.1 também apresentou distribuição ampla na região norte do estado, ocorrendo nas bacias dos rios Paranapanema, Pirapó e Tibagi. Nesta bacia, ainda ocorreu na porção média, mais especificamente no ponto 72, localizado no rio Preto, em sintopia com *Astyanax* sp.2 (Figura 11). Em alguns locais, essa espécie pode ocorrer com *A. bockmanni*.

A distribuição de *Astyanax* sp.3 foi a mais restrita quando comparados todos os grupos estudados, ficando restrita a um ponto do alto rio Iguaçu (Figura 11).

Já o grupo de *Astyanax serratus*, foi identificado para dois diferentes pontos do alto rio Iguaçu, ficando também restrito à essa bacia (Figura 11).

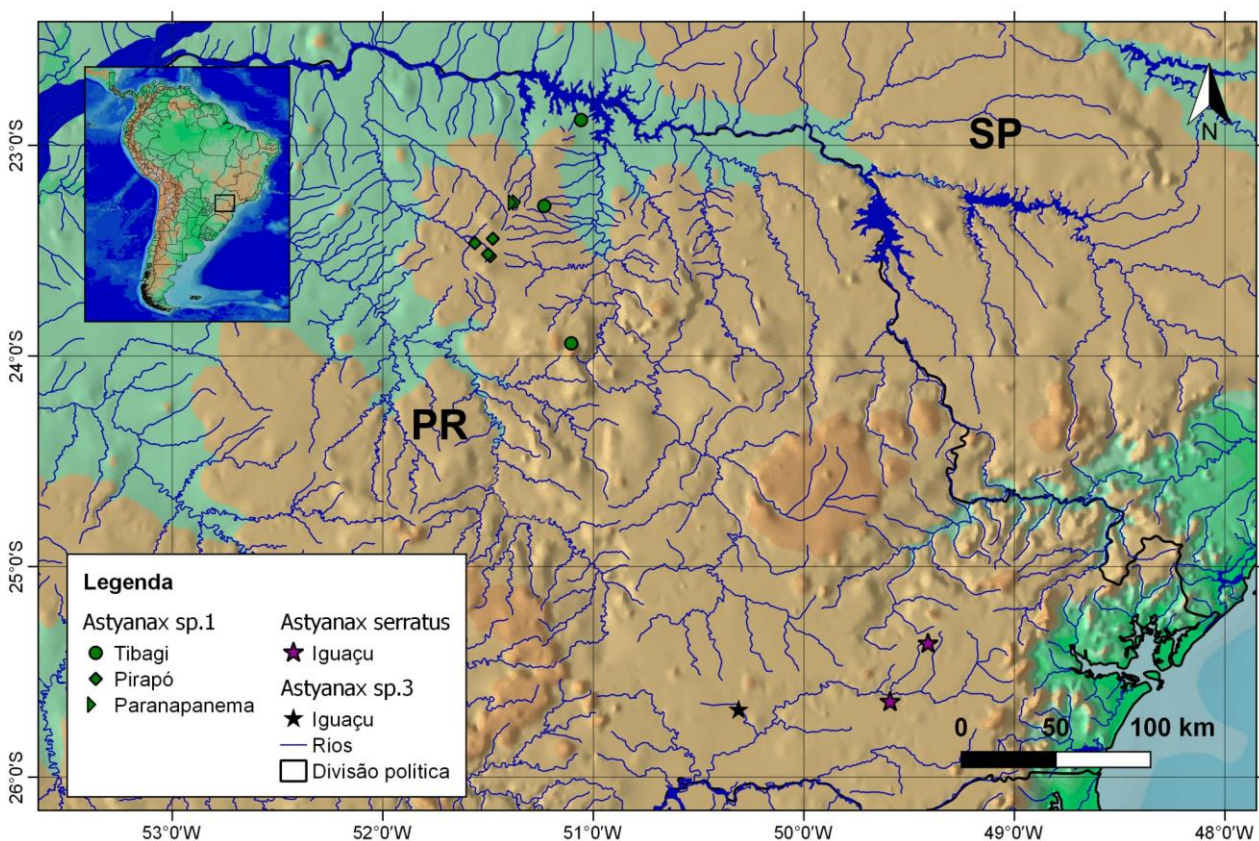


Figura 11. Área de distribuição das amostras de *Astyanax* sp.1 (pontos verdes), *Astyanax* sp.3 (ponto preto) e *Astyanax serratus* (pontos roxos). Bacias hidrográficas representadas por diferentes símbolos.

O grupo com a distribuição geográfica mais ampla foi *Astyanax paranae*, ocorrendo por toda a bacia do rio Tibagi, além de várias localidades da bacia dos rios Cinzas, Itararé, Ivaí,

Paranapanema e Pirapó (Figura 12). Devido à amplitude de distribuição, essa espécie ocorreu em sintopia com *Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.1.

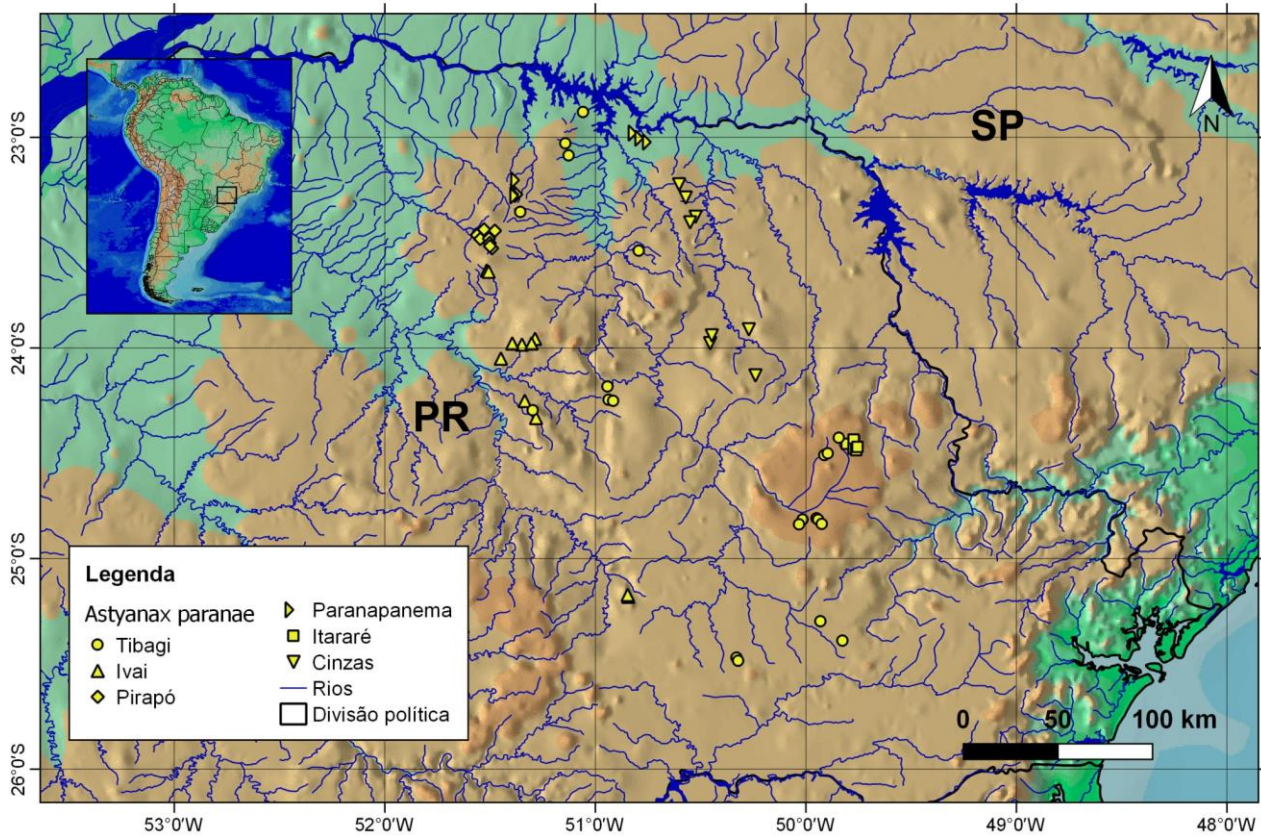


Figura 12. Área de distribuição das amostras de *Astyanax paranae* (pontos amarelos). Bacias hidrográficas representadas por diferentes símbolos.

2.4 DISCUSSÃO

A partir do uso integrado de análises morfométricas (morfometria geométrica), análise de distância genética e de delimitação de espécies (GMYC) em espécimes do “complexo *A. scabripinnis*”, foi possível identificar as diferentes espécies ocorrentes, assim como a suas áreas de distribuição.

Os resultados da análise morfométrica indicam uma diferença consideravelmente grande para dois dos quatro grupos analisados da bacia do rio Tibagi. Os grupos *Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.2, se mostraram totalmente isolados no gráfico de dispersão dos escores da MANOVA/CVA e apresentaram formas extremas na comparação geral da forma do corpo dos seis grupos. A variação entre estes dois grupos é mais acentuada que as encontradas por Castro *et al.* (2014) que analisaram quatro diferentes populações reprodutivamente isoladas de *Astyanax scabripinnis* (três riachos do estado de São Paulo e um riacho da cidade de Maringá, estado do Paraná) considerando-as em processo de especiação.

Observando os resultados da mesma análise para outros três grupos, *Astyanax paranae*, *Astyanax* sp.1 e *Astyanax* sp.3, há uma sobreposição da dispersão dos escores individuais de cada grupo. Adicionalmente, suas formas corporais podem ser classificadas como intermediárias em relação às de *Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.2, apresentando ainda uma baixa variação morfológica entre si. A íntima associação desses grupos, principalmente entre *Astyanax paranae* e *Astyanax* sp.3, pode ser também observada na árvore UPGMA de distância euclidiana, caracterizando-os como grupos morfológicamente muito similares, o que nos leva a crer que exemplares de ambos os grupos podem ter sido analisados na descrição de *Astyanax paranae*.

Embora *Astyanax serratus* tenha apresentado o mesmo padrão morfológico do “complexo *A. scabripinnis*”, difere das espécies desse complexo pela mancha umeral escura no sentido horizontal e geralmente com um prolongamento vertical descendente fraco e

estreito e também por possuir o terceiro infraorbital estreito e profundo, que não possui contato com pré-opérculo, deixando uma área nua nessa região.

O gráfico com a sobreposição dos consensos dos grupos alinhados mostrou variação principalmente para os *landmarks* relacionados à altura do corpo, tamanho do olho, e comprimento da base da nadadeira anal. Estudando quatro populações de *Astyanax scabripinnis* isoladas reprodutivamente, Castro *et al.* (2014) também evidenciaram uma grande variação do comprimento da base da nadadeira anal entre diferentes populações analisadas, o que possibilitou supor que essas populações estivessem em processo de especiação.

O menor comprimento para as bases das nadadeiras dorsal e anal, em especial essa última, apresentados por *Astyanax* sp.2, pode ser um potencial caráter diagnóstico em sua descrição, uma vez que este foi extremamente discrepante quando comparado com todos os congêneres, inclusive quando comparado a exemplares externos ao “complexo *A. scabripinnis*” oriundos exclusivamente de outra bacia, como foi o caso dos exemplares do rio Iguaçu. Além disso, o fato da espécie em questão caracterizar-se como a mais distante na árvore UPGMA de distância euclidiana, evidenciou possuir a forma com maior divergência dentre todos os grupos.

Os valores de distância genética intraespecíficos para os grupos analisados se mostraram bastante baixos (< 0,15%) para a maioria dos grupos, apenas o grupo *Astyanax paranae* apresentou um valor um pouco maior de distância intraespecífica (0,5848%), porém, esse número é bastante inferior a valores máximos e próximo a valores médios de distância intraespecífica encontrados em estudos com espécies de peixes do alto rio Paraná, como por exemplo os valores encontrados por Pereira *et al.*, 2013 (0% - 8,5%, média = 1,3% média) e Frantine-Silva *et al.*, 2015 (0% - 2,82, média = 0,17%).

Para as análises de distância genética interespecíficas, as sequências foram submetidas ao banco de dados mundial de sequências *Barcode (Bold Systems)* onde foi encontrada uma alta correspondência dessas sequências com sequências identificadas como *Astyanax fasciatus*. Entretanto, as fotos dos *vouchers* de algumas dessas sequências mostram uma confusão na identificação desses espécimes. Além disso, uma análise de distância genética intraespecífica dessas sequências do banco de dados, mostrou um valor alto de 1,7%. Dessa forma, não foram incorporadas sequências do banco de dados na análise nem levada em consideração as informações presentes no mesmo. Para que esse banco de dados fosse mais confiável, seria necessária a inclusão de espécies identificadas por especialistas e provenientes da localidade tipo.

No que diz respeito às distâncias genéticas interespecíficas, os grupos formados por indivíduos não pertencentes ao “complexo *A. scabripinnis*” (*Astyanax* sp.3 e *Astyanax serratus*), apresentaram valores maiores que os normalmente adotados para identificar diferentes espécies para o alto rio Paraná (2%) (Ward *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011), sendo sempre superiores a 3%. Já para os grupos membros do complexo, *Astyanax paranae* apresentou altos valores de distância quando comparado aos outros dois grupos, *Astyanax* sp.1 (2,6698%) e *Astyanax* sp. 2 (3,3083%). Quando comparado ao grupo *Astyanax bockmanni*, *Astyanax paranae* apresentou uma distância igualmente alta para esse grupo (2,9541%), sugerindo então, que *Astyanax paranae* se trata de uma espécie distinta das demais.

Quanto aos outros dois grupos do complexo, *Astyanax* sp.1 e *Astyanax* sp.2, apresentaram uma distância interespecífica de 1,0475%, valor um pouco menor do que o estabelecido para identificação de espécies de peixes do alto rio Paraná. Porém, estudos com *Astyanax* do México e da América Central mostram que 90% das espécies desse gênero que ocorrem na Mesoamérica possuem de 1% a 5% de divergência genética interespecífica (Ornelas-García *et al.*, 2008).

Astyanax bockmanni por sua vez, também apresentou valores de distância genética um pouco menores do que os estabelecidos para a identificação de espécies, 0,4164% e 0,9744% quando comparado a *Astyanax* sp.1 e *Astyanax* sp.2, respectivamente, demonstrando então possuir uma baixa divergência genética, principalmente com *Astyanax* sp.1. Podendo ser comparado a exemplares do gênero *Hypostomus*, que em análises da mesma região mitocondrial, apresentam distância genética interespecífica com valores próximos aos aqui observados, sendo essas as vezes menores até mesmo que as distâncias genéticas intraespecíficas para esse grupo (Pereira *et al.*, 2013).

A análise GMYC mostra a formação de cinco *clusters*, o que indica a identificação de cinco espécies para os dados analisados, sendo quatro desses *clusters* correspondentes aos grupos formados *a priori*, e um *cluster* combinando indivíduos de dois grupos (*Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.1). O que chama a atenção nessa análise é o tempo de divergência estimado para o grupo, aproximadamente 2 milhões de anos, evidenciando tratar-se de um grupo bastante recente.

O *cluster* 1 foi formado por espécimes do grupo *Astyanax* sp.1 e *Astyanax bockmanni*, e embora a análise sugira que esses dois grupos correspondam a uma única espécie, os indivíduos identificados como *Astyanax bockmanni*, formaram um sub-*cluster* dentro do *cluster* 1, mesmo sendo de três diferentes locais, mostrando que são iguais entre si e diferentes de *Astyanax* sp.1. Porém, devido ao curto tempo de divergência, ainda não se diferenciaram o suficiente para serem detectados pela análise. Fato que reforça essa teoria é que os grupos apresentaram uma clara separação para eixo 1 da análise multivariada de morfometria geométrica, além de *Astyanax bockmanni* possuir caracteres diagnósticos consistentes que o diferenciam de todos os seus congêneres do alto rio Paraná, inclusive quando comparado a *Astyanax paranae*, membro do “complexo *A. scabripinnis*”, como por exemplo quanto ao número de vértebras, possuindo 33 ou 34 vértebras (vs. 35 ou 36 em *A. paranae*) e também

com relação aos raios ramificados da nadadeira anal, possuindo de 19 a 25 raios (vs. 15 a 17 em *A. paranae*) (Vari & Castro, 2007).

O *cluster 2* incorpora os indivíduos do grupo *Astyanax* sp.2, confirmando os dados apresentados pela análise morfológica, onde o grupo *Astyanax* sp.2 apresentou total isolamento dos demais grupos para o eixo canônico 1, mostrando-se também como grupo mais distante na árvore de UPGMA a partir das distâncias euclidianas dos centróides dos grupos obtidos da MANOVA/CVA.

Enquanto o *cluster 3* compreende aos espécimes do grupo *Astyanax paranae*, inclusive os exemplares coletados no município de Castro no Paraná, local determinado como localidade-tipo para a espécie *Astyanax paranae*. O fato de todos os indivíduos do grupo *Astyanax paranae* se inserirem em um único *cluster*, confirma os resultados da análise de distância genética, que mostram uma alta divergência desse grupo com todos os demais, inclusive de *Astyanax bockmanni*.

Os *clusters 5* e *6*, incorporam indivíduos dos grupos *Astyanax serratus* e *Astyanax* sp.3, respectivamente, o que demonstra a existência de outras espécies na localidade onde foram coletados espécimes da série tipo de *Astyanax paranae*, e uma vez que espécimes considerados como membros do complexo não foram identificados nesse local, isso reforça ainda mais a possibilidade de haver erros de identificação nos exemplares utilizados para a descrição da espécie.

Diante da integração dos resultados morfométricos e moleculares, os diferentes grupos foram considerados como espécies diferentes. Os grupos que mostraram uma forma corporal similar (*Astyanax paranae*, *Astyanax* sp.1 e *Astyanax* sp.3), para as análises de distância genética e de delimitação de espécies mostraram corresponder a táxons distintos. Já os grupos *Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.1 que mostraram baixa divergência genética, sendo incluídos no mesmo *cluster* pela análise de delimitação de espécies, mostraram diferenças

morfológicas que permitem sua separação. Resultados similares foram obtidos por Costa-Silva *et al.* (2015), que ao associar morfologia e análise de delimitação de espécies em *Rineloricaria*, identificaram espécies morfológicamente indistinguíveis, mas que possuíam grande divergência genética, que variavam de 1,1% em algumas morfoespécies, e que em casos extremos chegavam a 8,5%, assim como espécies que possuíam grande variação morfológica, mas que não eram sustentadas pois não possuíam divergência genética.

O próprio trabalho que identifica o “complexo *A. scabripinnis*” faz o uso de análise integrativa entre morfometria multivariada e citogenética, para demonstrar sua existência (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Isso mostra a importância de se utilizar técnicas morfológicas associadas a ferramentas genéticas para chegar a uma identificação mais consistente de espécies.

Quanto à distribuição das espécies pertencentes ao complexo e *Astyanax bockmanni*, uma espécie apresentou uma ampla distribuição, duas apresentaram distribuição intermediária e uma última, uma distribuição restrita ao longo das bacias amostradas. *Astyanax paranae* foi a que apresentou a maior área de distribuição, ocorrendo em quase todas as bacias amostradas, mostrando ser uma espécie amplamente distribuída, sendo que indivíduos identificados com diferentes nomes relacionados a *Astyanax paranae* foram registrados para diferentes riachos da bacia do rio Tibagi em estudos anteriores (Shibatta *et al.*, 2002; Artoni & Shibatta, 2006; Galves *et al.*, 2007; Shibatta *et al.*, 2007). Um fato que chama a atenção nesse sentido, foi que apesar de estar amplamente distribuído, *Astyanax paranae* aparentemente não ocorre na bacia do Ribeira de Iguape, talvez pelo fato da bacia em questão estar totalmente inserida no primeiro planalto paranaense, região com grande diferença de altitude, o que pode impedir sua dispersão.

Já *Astyanax bockmanni* e *Astyanax* sp.1, foram encontradas apenas nos rios Tibagi, Paranapanema e Pirapó. Entretanto, esses dados com certeza são subestimados, pois *Astyanax*

bockmanni, possui vários registros para a região, e espécimes com o morfótipo de *Astyanax* sp.1 já foram encontrados em outros locais da bacia do rio Tibagi.

Por fim, *Astyanax* sp.2 foi identificada apenas para o rio Tibagi, o que sugere sua distribuição restrita a essa bacia, e ainda a um curto trecho de ocorrência.

Embora seja reconhecida uma preferência por riachos de pequeno porte e áreas de cabeceira para as espécies desse complexo (Shibatta *et al.*, 2002; Veregue & Orsi, 2003), a ampla e intermediária distribuição geográfica apresentada por algumas das espécies aqui analisadas sugere que as calhas principais dos rios não constituem barreiras físicas no deslocamento das espécies. O mesmo, não pode ser sugerido para a formação geológica de três planaltos ao longo da bacia do rio Tibagi, que apesar de não formar barreiras expressivas à dispersão da espécie, uma vez que a espécie *Astyanax paranae* encontra-se amplamente distribuída pelo segundo e terceiro planaltos, parece influenciar em alguns casos, como é caso da bacia do Ribeira do Iguape que se situa no primeiro planalto. Além disso, mesmo que essas espécies habitem as regiões de cabeceiras, não foram observadas compartilhamento entre as bacias dos rios Tibagi e Iguçu, não sustentando a hipótese de captura de cabeceiras para essas regiões como observado em outros trabalhos (Shibatta & Hoffmann, 2005; Artoni & Shibatta, 2006, Sant'anna *et al.*, 2006).

O fato de que todas as espécies do complexo apresentarem ocorrência simpátrica, com até três espécies ocorrendo simultaneamente no mesmo ponto amostral, também da análise morfométrica não evidenciar diferenças significativas entre todas as espécies, somado as topologias exibidas nas árvores de distância genética e bayesiana, apresentam-se como complicações a taxonomia do grupo para a área estudada, que podem ter levado Eigenmann a descrição de uma espécie (*Astyanax paranae*) a partir da combinação de exemplares de espécies diferentes.

A inclusão de *A. bockmanni* como um membro do “complexo *A. scabripinnis*”, mesmo não possuindo todas as características morfológicas desse grupo, demonstra que esse complexo de espécies forma um grupo monofilético.

O fato dos indivíduos coletados em Castro, Paraná se agruparem com os indivíduos das demais localidades nas análises moleculares, nos permitem determinar que os mesmos correspondem a *Astyanax paranae*, mostrando-se como uma espécie amplamente distribuída na bacia do rio Tibagi e áreas adjacentes.

Os dados aqui apresentados apontam para a existência de quatro espécies do “complexo *A. scabripinnis*” na área amostrada, *Astyanax* sp.1, *Astyanax* sp.2, *Astyanax paranae* e a espécie aqui incluída, *Astyanax bockmanni*. Fazendo-se necessário então, a descrição de duas novas espécies, *Astyanax* sp.1, *Astyanax* sp.2.

Deste modo, fica evidente a necessidade de integrar ferramentas que possibilitem uma identificação precisa em estudos de identificação de espécies de peixes, principalmente se tratando de grupos complexos, como no caso do gênero *Astyanax*, contribuindo assim para o aumento do conhecimento da biodiversidade e para que erros taxonômicos sejam cada vez menos frequentes nas descrições ictiológicas.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilhoa VA, Duboc LF. 2007.** A new species of the freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. *Zootaxa* **1587**: 43-52.
- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL, Polz MF. 2004.** Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**:551–554.
- Alcaraz HSV, Pavanelli CS, Bertaco VA. 2009.** *Astyanax jordanensis* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Iguaçu basin, Paraná, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **7**: 185-190.
- Artoni RF, Shibatta OA. 2006.** *Peixes do Parque Estadual de Vila Velha: aspectos da história natural, da biologia evolutiva e da conservação*. Ponta Grossa, Editora UEPG, 153 p.
- Baird SF, Girard CF. 1854.** Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the US and Mexican boundry survey and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet and Charles Girard: *From the Proceedings of Academy of Natural Sciences*, March 1854, USA.
- Barraclough TG, Birky, CWJR, Burt A. 2003.** Diversification in sexual and asexual organisms. *Evolution* **57**:2166–2172.
- Berbel-filho WM, Martinez PA, Ramos TP, Torres RA, Lima SM. 2016.** Inter-and intra-basin phenotypic variation in two riverine cichlids from northeastern Brazil: potential eco-evolutionary damages of São Francisco interbasin water transfer. *Hydrobiologia*, **766**: 43-56.
- Bertaco VA. 2014.** *Astyanax douradilho*, a new characid fish from the rio Tramandaí system, southern Brazil (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*. **3794**: 492–500.
- Bertaco VA, Carvalho FR, Jerep FC. 2010.** *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* **8**: 265-275.
- Bertaco VA, Lucena CAS. 2006.** Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Neotropical Ichthyology* **4**: 53-60.
- Bertaco VA, Malabarba LR. 2001.** Description of two new species of *Astyanax* Baird & Girard (Teleostei: Characiformes: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the. *Ichthyological Exploration Freshwaters* **12**: 221-234.
- Bookstein FL. 1989.** “Size and shape”: a comment on semantics. *Systematic Biology*, **38**: 173-180.
- Britski, HA. 1972.** Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: *Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública /USP – Instituto de Pesca/CPRN. p. 79-108.

- Calcagnotto D, Schaefer AS, Desalle R. 2005.** Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**: 135-153.
- Carvalho D, Denise AAO, Pompeu OS, Leal CG, Oliveira C, Hanner R. 2011.** Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* **22**: 80–86.
- Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta OA, Santos MH, Nogaroto V, Vicari MR, Almeida MC, Artoni RF. 2014.** Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **25**: 231-244.
- Costa-Silva GJ, Rodriguez MS, Roxo FF, Foresti F, Oliveira, C. 2015.** Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. *PloS one* **10**: e0135075.
- Drummond AJ, Bouckaert RR. 2015.** *Bayesian evolutionary analysis with BEAST*. Cambridge University Press.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* **7**: 214.
- Eigenmann, CH. 1914.** Some results from studies of South American fishes IV. *New genera and species os South American fishes*. Indiana University Studies **20**: 44-48.
- Eigenmann CH. 1917.** The American Characidae. Part 1. *Memoirs of Museum of Comparative Zoology* **43**: 1-102.
- Eigenmann CH. 1921.** The American Characidae. Part 3. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology* **43**: 208-310.
- Eigenmann CH. 1927.** The American Characidae. Part 4. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology* **43**: 311-428.
- Eschmeyer, WN, Fong, JD. 2016.** Species by family/subfamily. Catalog of Fishes endereço eletrônico: <http://research.calacademy.org> (acessado em 19 de fevereiro de 2016).
- Fontaneto D, Herniou EA, Boschetti C, Caprioli M, Melone G, Ricci C, Barraclough TG. 2007.** Independently evolving species in a sexual bdelloid rotifers. *PLoS Biol.* **5**:e87
- França DV.** O rio Tibagi no contexto hidrogeográfico paranaense, em: Medri, ME.; Bianchini, E.; Shibatta, OA.; Pimenta, JA. 2002. *A bacia do rio Tibagi*, 595 p.
- Frantine-silva W, Sofia SH, Orsi ML, Almeida FS. 2015.** DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular ecology resources*, **15**: 1226-1237.
- Galves W, Jerep FC, Shibatta, OA. 2007.** Estudo da condição ambiental pelo levantamento da fauna de três riachos na região do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina, PR, Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **2**: 55-65.
- Garavello JC, Sampaio FAA. 2010.** Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Brazilian Journal of Biology* **70**: 847-865.

- Geiger MF, Schreiner C, Delmastro GB, Herder F. 2016.** Combining geometric morphometrics with molecular genetics to investigate a putative hybrid complex: a case study with barbels *Barbus* spp. (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of fish biology*.
- Gomes AL, Azevedo P. 1960.** Os peixes de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. *Papéis Avulsos*, Departamento de Zoologia, SP **14**: 133-151.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser. External Resources Chemical Abstracts Service (CAS)*. **41**: 95–98
- Hajibabaei M, Waard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Hebert PDN. 2005.** Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **360**: 1959–1967.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan, PD. 2004.** PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 1-9.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SA. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society. Series B: Biological sciences* **270**: 313–334.
- Heled J, Drummond AJ. 2010.** Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular biology and evolution* **27**: 570-580.
- Hubert N, Renno J. 2006.** Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* **33**: 1414-1436.
- Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR. 2010.** Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 498–511.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Klingenberg CP. 2002.** Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* **287**: 3–10.
- Lahaye R, Vanderbank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. 2008.** DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:2923–2928.
- Lima FCT, Buckup PA, Menezes NA, Lucena CAS, Lucena ZMS, Toledo-Piza M, Zanata A. 2007.** Família Characidae: gêneros incertae sedis. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série Livros*, **23**: 44-62.
- Lima FCT, Malabarba RL, Buckup PA, Pezzi JFS, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Casatti L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF. 2003.** Genera incertae sedis in Characidae. Pp. 134-141. In: Reis, RE.; Kullander SO.; Ferraris CJ. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 729 p.
- Lucena CAS, Calegari BB, Pereira E.H.L. Dallegre E. 2013.** O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia* **105**: 20–24.

- Lucena CAS, Castro JB, Bertaco VA. 2013.** Three new species of *Astyanax* from drainages of southern Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **11**: 537-552.
- Mirande JM. 2010.** Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* **8**: 385-568.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 1991.** *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazil. J. Genetics* **14**: 331-357.
- Nylander JAA. 2004.** *MrModeltest* v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.
- Oliveira CAM, Abilho AV, Pavanelli CS. 2013.** *Astyanax guaricana* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Cubatão drainage, Paraná State, Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **11**: 291-296.
- Oliveira C, Avelino GS, Abe K, Mariguela T, Benine R, Orti G, Vari R, Castro RMC. 2011.** Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 1–25.
- Ornelas-García C, Domínguez-Domínguez O, Doadrio I. 2008.** Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC evolutionary biology* **8**:1-20.
- Papadopoulou A, Bergsten J, Fujisawa T, Monaghan MT, Barraclough TG, Vogler AP. 2008.** Speciation and DNA barcodes: testing the effects of dispersal on the formation of discrete sequence clusters. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **363**: 2987-2996.
- Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. 2013.** Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics* **14**: 20.
- Pereira LHG, Maia GMG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. 2011.** DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* **22**: 71-79.
- Pons J, Barraclough T, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran D, Hazell S, Kamoun S, Sumlin W, Vogler AP. 2006.** Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematics Biology* **55**: 595-609.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2013.** A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PloS one* **8**: e66213.
- Rohlf F. J. 2003.** *TPS Relw* v. 1.35. Stony Brook, NY, Department of Ecology & Evolution, State University of New York.
- Rohlf FJ. 2010a.** *TPS Dig*, v. 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf FJ 2010b.** *TPS Util* v. 1.46. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rosen, DE. 1972.** Origin of the characid fish genus *Bramocharax* and a description of a second, more primitive, species in Guatemala. *American Museum Novitates* **500**, 1-21.

- Rossini BC. 2015.** Estudo da diversidade e das relações filogenéticas do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) baseado em sequências de DNA. Botucatu, São Paulo. *Tese de doutorado* 117p.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p 310.
- Sant'anna JFM, Almeida MC, Vicari MR, Shibatta AO, Artoni RF. 2006.** Levantamento rápido de peixes em uma lagoa marginal do rio Imbituva na bacia do Alto rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa*. **12**: 39-46.
- Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST, Silva-Souza AT. 2002.** Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi, p. 403-423. Em: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (Eds). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, UEL, 595p.
- Shibatta OA, Hoffmann AC. 2005.** Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **22**: 366-371.
- Shibatta OA, Gealh AM, Bennemann ST. 2007.** Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* **7**: 125-134.
- Tagliacollo VA, Britzke R, Silva GSC, Benine RC. 2011.** *Astyanax pirapuan*: a new characid species from the upper Rio Paraguay system, Mato Grosso, Central Brazil (Characiformes, Characidae). *Zootaxa* **2749**: 40-46.
- Talavera G, Dincă V, Vila R. 2013.** Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution* **4**: 1101-1110.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
- Taylor WR, Van Dyke GC. 1985.** Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* **9**: 107-119.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**: 4673-4680.
- Togawa RC, Brigido MM. 2003.** PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi*.Ribeirão Preto
- Vari RP, Castro RMC. 2007.** New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* **2007**: 150-162.
- Veregue AML, Orsi ML. 2003.** Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* **20**: 97-105.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009.** The campaign to DNA barcode all fishes. *Journal of fish biology* **74**: 329-56.

Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, *Biological sciences* **360**: 1847–1857.

Weitzman SH, Malabarba LR. 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). Pp. 161-170. IN: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, *Edipucrs*.

Zanata AM, Camelier P. 2008. Two new species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) from upper rio Paraguaçu and rio Itapicuru basins, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. *Zootaxa* **1908**: 28-40.

Zanata AM, Camelier P. 2009. *Astyanax vermilion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **7**: 175-184.

APÊNDICE

Apêndice 1. Lista de material examinado para as análises morfológicas e moleculares.

P	Latitude (S)	Longitude (O)	Bacia	Espécies					
				<i>Astyanax bockmanni</i>	<i>Astyanax</i> sp.1	<i>Astyanax paranae</i>	<i>Astyanax</i> sp.2	<i>Astyanax</i> sp.3	<i>Astyanax serratus</i>
P01	25°40'55.0"	050°18'34.4"	Iguaçu					MZUEL14416 ^{1,2}	
P02	25°21'59.6"	049°24'35.6"	Iguaçu						MZUEL14417 ^{1,2}
P03	25°38'34.95"	049°35'24.5"	Iguaçu						MZUEL14418 ^{1,2}
P04	23°27'49.5"	51°33' 44.9"	Pirapó		MZUEL14365 ²	MZUEL14376 ¹			
P05	23°28'55.1"	51°32'45.8"	Pirapó			MZUEL14377 ¹			
P06	23°28'48.3"	51°30'19.2"	Pirapó			MZUEL14378 ¹			
P07	23°31'34.1"	51°29'24.6"	Pirapó		MZUEL14366 ²	MZUEL14379 ^{1,2}			
P08	23°30'58.9"	51°30'00.8"	Pirapó		MZUEL14367 ²				
P09	23°30'04.7"	51° 30'5.8"	Pirapó			MZUEL14380 ¹			
P10	23°27'54.9"	51°32'00.2"	Pirapó	MZUEL14370 ¹		MZUEL14381 ¹			
P11	23°26'12.0"	51°31' 42.9"	Pirapó			MZUEL14382 ¹			
P12	23°26'34.8"	51°28'37.3"	Pirapó	MZUEL14419 ²	MZUEL14362 ²	MZUEL14383 ¹			
P16	24°27'16.8"	49°48'21.1"	Itararé			MZUEL14384 ¹			
P17	24°26'28.0"	49°46'15.8"	Itararé			MZUEL14385 ¹			
P18	24°26'04.4"	49° 46'21.4"	Itararé			MZUEL14386 ¹			
P19	24° 28'40.9"	49°46'22.2"	Itararé			MZUEL14387 ¹			
P20	24°29'05.7"	49°45'37.9"	Itararé			MZUEL14388 ¹			
P21	24°28'10.0"	49°45'16.4"	Itararé			MZUEL14389 ¹			
P22	22° 58'45.7"	50°48'16.3"	Paranapanema			MZUEL14390 ¹			
P23	23°00'13"	50°46'22"	Paranapanema	MZUEL14371 ¹					
P24	23°01'19.3"	50°44'10.6"	Paranapanema	MZUEL14372 ¹					
P25	23°16'14.8"	51°20'47.7"	Paranapanema	MZUEL14373 ¹	MZUEL14363 ²	MZUEL14391 ^{1,2}			
P26	23°16'38.9"	51°21'58.9"	Paranapanema			MZUEL14392 ¹			
P27	23°16'17.7"	51°21'56.2"	Paranapanema		MZUEL14364 ²	MZUEL14393 ¹			
P28	23°12'10.4"	51°21'43.1"	Paranapanema			MZUEL14394 ¹			
P29	23°37'54.5"	51°30'55.1"	Ivaí			MZUEL14395 ¹			
P30	23°38'15.2"	51°30'23.7"	Ivaí			MZUEL14396 ¹			
P31	25°10'19.9"	50°50'45.1"	Ivaí			MZUEL14397 ¹			

P	Latitude (S)	Longitude (O)	Bacia	Espécies					
				<i>Astyanax bockmanni</i>	<i>Astyanax</i> sp.1	<i>Astyanax paranae</i>	<i>Astyanax</i> sp.2	<i>Astyanax</i> sp.3	<i>Astyanax serratus</i>
P32	23°58'41.7"	51°23'39.2"	Ivaí			MZUEL14398 ¹			
P33	25°10'51.3"	50°50'36.6"	Ivaí			MZUEL14399 ¹			
P34	23°57'21.2"	51°17'10.5"	Ivaí			MZUEL14400 ^{1,2}			
P35	23°58'41.4"	51°18'08.6"	Ivaí			MZUEL14401 ¹			
P36	24°03'0.8"	51°26'53.9"	Ivaí			MZUEL14402 ^{1,2}			
P37	24°15'03.4"	51°20'06.1"	Ivaí			MZUEL14403 ^{1,2}			
P38	24°19'55"	51°16'53.3"	Ivaí			MZUEL14404 ¹			
P39	23°58'60.0"	51°20'53.3"	Ivaí			MZUEL14405 ²			
P40	23°13'23.6"	50°36'06.5"	Cinzas	MZUEL14374 ¹		MZUEL14406 ¹			
P41	23°54'41.2"	50°16'13.5"	Cinzas			MZUEL14407 ¹			
P42	23°22'37.0"	50°31'23.6"	Cinzas			MZUEL14408 ^{1,2}			
P43	23°17'08.9"	50°34'13.3"	Cinzas			MZUEL14409 ^{1,2}			
P44	24°07'49.6"	50°14'20.4"	Cinzas			MZUEL14410 ¹			
P45	23°58'38.5"	50°27'15.6"	Cinzas			MZUEL14411 ¹			
P46	23°56'25.8"	50°26'47"	Cinzas			MZUEL14412 ¹			
P47	23°24'12.9"	50°32'57.4"	Cinzas	MZUEL14375 ¹		MZUEL14413 ¹			
P48	22°52'44.8"	51°03'30.1"	Tibagi	MZUEL10388 ^{1,2}	MZUEL10389 ²	MZUEL13486 ¹			
P49	23°01'39.8"	51°08'32.7"	Tibagi	MZUEL10386 ^{1,2}		MZUEL10390 ¹			
P50	23°01'17.4"	51°07'58.2"	Tibagi	MZUEL10387 ^{1,2}					
P51	23°05'5.6"	51°07'36.8"	Tibagi			MZUEL10385 ¹			
P52	25°17'50"	49°55'50.4"	Tibagi			MZUEL10127 ¹			
P53	25°23'21.8"	49°49'34"	Tibagi			MZUEL10129 ¹			
P54	23°24'55.81"	51°24'03.49"	Tibagi	MZUEL10321 ¹					
P55	23°25'41.6"	51°23'00.2"	Tibagi	MZUEL10319 ¹					
P56	23°21'12.9"	51°21'22.5"	Tibagi			MZUEL10320 ¹			
P57	24°30'28.7"	49°54'42.9"	Tibagi			MZUEL10357 ¹			
P58	24°29'59.5"	49°53'45.1"	Tibagi			MZUEL14414 ¹			
P59	24°25'32.4"	49°50'35.9"	Tibagi			MZUEL10358 ¹			
P60	23°29'07.1"	50°45'20.3"	Tibagi	MZUEL10141 ¹					
P61	23°33'13.8"	50°46'00.5"	Tibagi	MZUEL10143 ¹					

P	Latitude (S)	Longitude (O)	Bacia	Espécies					
				<i>Astyanax bockmanni</i>	<i>Astyanax</i> sp.1	<i>Astyanax paranae</i>	<i>Astyanax</i> sp.2	<i>Astyanax</i> sp.3	<i>Astyanax serratus</i>
P62	23°34'43.5"	50°47'8.9"	Tibagi	MZUEL10145 ¹					
P63	23°32'14.8"	50°47'37.4"	Tibagi			MZUEL10144 ¹			
P64	25°28'12.6"	50°19'44.4"	Tibagi			MZUEL10174 ¹			
P65	25°29'4.8"	50°19'17.5"	Tibagi			MZUEL10175 ¹			
P66	24°10'56.5"	50°56'31.5"	Tibagi			MZUEL10342 ¹			
P67	24°14'42.8"	50°56'12.9"	Tibagi			MZUEL10343 ¹			
P68	24°15'01"	50°54'55"	Tibagi			MZUEL10344 ¹			
P69	24°40'09.0"	50°53'20.8"	Tibagi			MZUEL14415 ¹			
P70	24°16'49.16"	50°34'58.19"	Tibagi				MZUEL14368 ²		
P71	24°21'9.07"	50°34'36.00"	Tibagi				MZUEL14369 ²		
P72	23°56'24"	51°06'16"	Tibagi		MZUEL05001 ^{1,2}		MZUEL05009 ^{1,2}		
P73	23°17'15"	51°13'58"	Tibagi		MZUEL04912/ 04933 ^{1,2}				
P74	24°21'44.7"	50°33'53.9"	Tibagi				MZUEL08623/082 00 ^{1,2}		
P75	24°21'44.2"	50°34'7.6"	Tibagi				MZUEL11051/110 48 ¹		
P76	24°48'50.70"	50° 0'55.30"	Tibagi			MZUEL14557 ²			
P77	24°50'13.40"	50° 1'55.80"	Tibagi			MZUEL14558 ²			
P78	24°48'30.10"	49°56'56.80"	Tibagi			MZUEL14559 ²			
P79	24°48'52.60"	49°56'28.90"	Tibagi			MZUEL14560 ²			
P80	24°50'6.20"	49°55'27.00"	Tibagi			MZUEL14561 ²			

¹invíduos utilizados nas análises de morfometria geométrica. ²invíduos utilizados nas análises moleculares.