

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

DANIEL MENEGUELLO LIMEIRA

ESTUDOS GENÉTICO-POPULACIONAIS EM *Astyanax* aff. *scabripinnis* DA
REGIÃO DA SERRA DA MANTIQUEIRA

SÃO CARLOS-SP
2018

DANIEL MENEGUELLO LIMEIRA

ESTUDOS GENÉTICO-POPULACIONAIS EM *Astyanax* aff. *scabripinnis* DA REGIÃO
DA SERRA DA MANTIQUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

São Carlos-SP
2018




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular


Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Daniel Meneguello Limeira, realizada em 19/10/2018:


Prof. Dr. Roberto Ferreira Antoni
UEPG


Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar


Prof. Dr. Pedro Manoel Galati Junior
UFSCar


Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti
UNESP


Prof. Dr. Mateus Henrique dos Santos
UEPG

Para Flavia e Lorenzo, com amor.

AGRADECIMENTO

A Deus.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, a quem considero não só orientador, mas também um amigo. Ao longo desses anos, não mediu esforços em viabilizar a execução deste projeto nem em transmitir seus conhecimentos, que vão muito além do campo científico.

À Flavia, minha esposa, minha companheira, sem ela nada disso seria possível. Por sua paciência, por seu apoio e suporte; enfim por todo amor a mim dedicado.

Ao Lorenzo, meu filho, que tem tornado meus dias mais felizes e tem feito a luta valer a pena.

À minha mãe, Maria Irani, por todo o suporte e dedicação ao longo de uma vida e principalmente nessa etapa final do doutorado.

Ao meu irmão Leonardo, minha cunhada Simone e meu sobrinho Bernardo, que mesmo separados pela distância, permaneceram sempre por perto me incentivando.

À minha sogra Marlene e minha cunhada Ana Luisa, por toda a ajuda e incentivo.

A meu pai Irineu, que antes de partir, deixou-me ensinamentos que levarei por toda a vida.

Ao Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus pela disponibilidade na coorientação e por toda ajuda no desenvolvimento desta tese, desde a sua concepção até sua finalização.

Ao Prof. Dr. Mateus Henrique dos Santos por toda a colaboração no desenvolvimento desse trabalho, principalmente na resolução das dúvidas metodológicas, e por ter aceito fazer parte da banca.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, grande conhecedor dos organismos utilizados nesse trabalho, pelas valiosas dicas e pela valiosa ajuda para as coletas. Agradeço também por ter aceitado fazer parte da banca.

Aos Profs. Drs. Pedro Manoel Galetti Junior e Fábio Porto Foresti por terem auxiliado na produção deste trabalho, através de sua produção científica e por terem, gentilmente, aceitado o convite para compor a banca.

Ao Piau e Toninho, pelo esforço e parceria durante as coletas.

Aos colegas de laboratório e de profissão, Jonathan, Luz e Patrícia, que muito me ajudaram no desenvolvimento deste projeto, desde o início, cedendo tecidos, emprestando materiais e me ensinando diversas técnicas.

Ao meu amigo Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara, por todos seus valiosos conselhos,

inestimável incentivo e por sua hospitalidade nas viagens a São Carlos.

Ao meu amigo Prof. Dr. Artur de Lima Preto, com quem muito aprendi e pela parceira dentro e fora do laboratório.

À Profa. Dra. Claudete Ruas e as doutorandas Sara e Renata, pelo auxílio material e intelectual nas genotipagens das populações.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. Foi uma grande honra e um grande prazer ter tido a oportunidade realizar meu doutorado juntos aos grandes geneticistas de peixes do Brasil.

Ao Instituto Federal Catarinense campus Araquari, na pessoa do Diretor Jonas Cunha Espíndola, que foi onde esse projeto teve início e uma parte dele foi realizado, onde me foi dado todo apoio, em termos de liberação para cursar disciplina e espaço para a realização das análises.

Ao Instituto Federal do Paraná campi Londrina e Telêmaco Borba, nas pessoas dos diretores Marcelo Lupion Poleti e Karina Mello Bolinaure, pela oportunidade de finalizar esta jornada.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, que através do Laboratório de Genética Evolutiva, permitiu que grande parte desse projeto fosse executado.

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Ao Sr. Paulo Salgado Ribeiro, proprietário do Sítio dos Curumins, Pindamonhangaba-SP, que nos acolheu e permitiu a coleta em sua propriedade em diferentes oportunidades.

Ao IBAMA e ao ICMBio que permitiu a coleta do material utilizado neste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"...E não há melhor resposta
que o espetáculo da vida:
vê-la desfiar seu fio,
que também se chama vida,
ver a fábrica que ela mesma,
teimosamente, se fabrica,
vê-la brotar como há pouco
em nova vida explodida;
mesmo quando é assim pequena
a explosão, como a ocorrida;
mesmo quando é uma explosão
como a de há pouco, franzina;
mesmo quando é a explosão
de uma vida Severina."

Joao Cabral de Melo Neto em Morte e Vida Severina

RESUMO

Os estudos genéticos de populações naturais há muito têm ajudado a comunidade científica e a sociedade em geral a compreender a evolução e conservação tanto dos ambientes quanto das comunidades. Estes estudos têm ajudado a definir o limite entre espécies, conceito extremamente importante, mas por vezes arbitrário e bastante variável entre os diversos grupos de seres vivos. De maneira semelhante, ajudam a conhecer o *status* de conservação de populações na natureza e a entender como a atividade antrópica ou a evolução natural das paisagens eleva o risco de extinção das populações. Neste sentido, o complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* tem sido considerado por muitos pesquisadores como um bom modelo para estudos evolutivos. Estes peixes são conhecidos por habitarem cabeceiras de riachos, formando populações isoladas com características morfológicas, genéticas e evolutivas próprias. Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre os padrões genéticos-populacionais de *A. scabripinnis*, foram elencadas seis populações da região da Serra da Mantiqueira, três pertencentes a bacia do Rio Sapucaí, tributário do Rio Grande na bacia do Alto Paraná e três da bacia do Paraíba do Sul. Com a utilização de marcadores baseados em microsatélites e DNA mitocondrial, procurou-se conhecer os níveis de variabilidade genética intra e interpopulacionais, identificar padrões de estruturação e de migração entre as populações e eventos de gargalos-populacionais. Além disso, buscou-se estabelecer relações entre a evolução geológica da paisagem, principalmente nas regiões mais altas da Serra da Mantiqueira e os padrões de isolamento e colonização observados. Entre os resultados mais relevantes, pode-se destacar que os níveis de variabilidade genética dentro das populações, quando comparadas a outras populações de *Astyanax*, são razoavelmente bons. Porém, quatro das populações apresentaram altos níveis de fixação gênica, o que sugere a ocorrência de endogamia e, entre elas, duas apresentaram evidências de eventos de gargalos populacionais, o que chama a atenção para seus *status* de conservação. Foi possível também observar diferenças evidentes entre duas das populações e as demais, o que permitiu inferir a separação mais antiga de uma delas e formação da outra através da colonização por indivíduos de outras populações, provavelmente por ação antrópica. Os resultados mostraram que a estruturação das populações não acompanha a separação destas simplesmente em duas bacias de drenagem e outros fatores da formação do planalto de Campos do Jordão (onde se encontram a maioria das populações utilizadas), tais como os movimentos tectônicos e capturas de drenagens recentes, devem ser

levado em consideração para entender os padrões observados. Por último, a hipótese que melhor explica a estruturação das populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* observada é a colonização da região a partir da bacia do Alto Paraná e dispersão ou vicariância para as cabeceiras da bacia do Paraíba do Sul.

Palavras-chave: microssatélites, Citocromo C Oxidase I, ATPase 6/8, variabilidade genética, estruturação populacional, filogeografia.

ABSTRACT

Genetic studies of natural populations have long been helping the scientific community and society in general to understand the evolution and conservation of both environments and communities. These studies have helped to define the boundary between species, and the concept of species, which is extremely important but sometimes arbitrary and quite variable among the various groups of living beings. In similar way, they help to know the status of conservation of populations in the wild and to understand how the anthropic activity or the natural evolution of the landscapes raises the risk of extinctions. In this sense, many researchers have considered the *Astyanax scabripinnis* species complex as a good model for evolutionary studies. These fish are known to inhabit headwaters streams, forming isolated populations with their own morphological, genetic and evolutionary characteristics. Aiming to deepen the knowledge about the genetic-population patterns of *A. scabripinnis*, six populations of the Serra da Mantiqueira region are have been selected, three belonging to the Sapucaí river basin, tributaries of the Grande river in the Upper Paraná basin, and three in the Paraíba do Sul basin. Using microsatellites based markers and mitochondrial DNA, we sought to know the intra and interpopulation genetic variability levels, to identify structure and migration patterns and bottleneck-population events. In addition, we sought to establish relationships between the geological evolution of the landscape, mainly in the higher regions of the Serra da Mantiqueira and the isolation and colonization patterns observed. Among the most relevant results, can be highlighted that the levels of genetic variability within the populations, when compared to other populations of *Astyanax*, are reasonably good. However, four of the populations had high levels of gene fixation suggesting the occurrence of inbreeding and two presented evidence of events of population bottlenecks, which draws attention to their conservation status. It was also possible to observe evident differences between two of the populations and the others, which allowed to infer the oldest separation of one and formation of the other through the colonization by individuals of varied populations, probably by anthropic action. The results showed that the population structure does not accompany the separation in two drainage basins and other factors of the formation of the Campos do Jordão plateau (where most of the populations are used), such as tectonic movements and drainage captures should be taken into account to understand the observed patterns. Finally, the hypothesis that best explains the structuring of the populations of *Astyanax* aff. *scabripinnis* observed is the colonization of the region from the

Upper Paraná basin and dispersion or vicariance for the headwaters of the Paraíba do Sul basin.

Keywords: microsatellites, Cytochrome C Oxidase I, ATPase 6/8, genetic variability, population structure, phylogeography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Exemplar de *A. scabripinnis* coletado na região da Serra da Mantiqueira 30
- Figura 2** Domínio da Floresta Atlântica em cinza (a) e remanescentes da Floresta Atlântica em preto (b), destacando o alto grau de fragmentação. Fonte: SOS Mata Atlântica. Disponível em <http://mapas.sosma.org.br/dados/#>. Acesso: 16/01/2018. 35
- Figura 3** Representação das bacias hidrográficas brasileiras otocodificadas, destacando a localização e a separação entre as bacias hidrográficas do Rio Grande (cinza escuro) e do Rio Paraíba do Sul (cinza claro). Fonte: Agencia Nacional de Águas. Disponível em: <http://metadados.ana.gov.br/geonetwork/srv/pt/main.home?uuid=fe192ba0-45a9-4215-90a5-3fba6abea174>. Acesso em 23/01/2018. 38
- Figura 4** Localização dos pontos de coleta em relação às bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul e em relação aos municípios de Guaratinguetá, Pindamonhangaba e Campos do Jordão. CP - Córrego das Pedras; PE - Córrego Perdizes; LC - Lago Capivari; RG - Ribeirão Grande; LV - Córrego Lavrinhas; RP - Ribeirão Pequeno. 40
- Figura 5** Matriz pareada de distância geográfica (em metros) entre seis pontos de coleta de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. 41
- Figura 6** Distâncias genéticas de DNA *Barcoding* entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira 52
- Figura 7** Valores de F_{ST} pareados de seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* das bacias do Rio Sapucaí e Paraíba do Sul. Onde, cinza claro indica valores entre 0 e 0,999, cinza médio indica valores entre 0,1 e 0,199 e cinza escuro indica valores maiores que 0,2. 57
- Figura 8** Análise Coordenadas Principais (PCoA) de seis populações de *A.* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. 57

- Figura 9** Estrutura de gráfico de barras (*bar plot*) gerado pelo software STRUCTURE 2.3.4 mostrando a estruturação de seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. (a): resultado da primeira rodada, mostrando a análise das seis populações e que resultou em $K = 2$; (b): resultado da segunda rodada, formada pelo grupo resultante da primeira rodada CP+PE+RGI+LV+RP, resultando em $K = 3$; (c): resultado da terceira rodada, formada pelo grupo resultante da segunda rodada PE+RGI+LV, resultando em $K = 2$; (d): resultado da quarta rodada, análise do grupo formado por PE+RGI, resultante da terceira rodada. **59**
- Figura 10** Taxas de imigração entre as seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da região da Serra da Mantiqueira. Acima, as linhas tracejadas representam a separação entre as bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul. A distância entre os círculos que representam as populações está em escala da distância real entre os pontos de coleta, porém a escala não é proporcional entre as bacias. Abaixo taxa de migração ($m_{i \rightarrow j}$) e a taxa de migração escalada pela taxa de mutação ($M_{i \rightarrow j}$) entre as seis populações. **60**
- Figura 11** Árvore de máxima verossimilhança, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. **64**
- Figura 12** Árvore de máxima verossimilhança, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. **65**
- Figura 13** Árvore de *neighbor-joining*, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. **66**
- Figura 14** Árvore de *neighbor-joining*, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. **67**
- Figura 15** Árvore de máxima parcimônia, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* **68**

da Serra da Mantiqueira.

- Figura 16** Árvore de máxima parcimônia, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, **69**
das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff.
scabripinnis da Serra da Mantiqueira.
- Figura 17** Árvore de inferência bayesiana concatenada, estimada pelos genes **70**
mitocondriais COI e ATPase, das relações filogenéticas entre seis
populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira
- Figura 18** Árvore de inferência bayesiana gerada pelo software BEAST 2, para seis **71**
populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Localidades, códigos das populações, municípios, coordenadas geográficas dos pontos de coleta e números dos vouchers (número de tombo) de museus de ictiologia/zoologia.	39
Tabela 2	Temperaturas de anelamento descritas por Zaganini et al. (2012), temperaturas de anelamento usadas no teste de gradiente e usadas em todas as amplificações.	43
Tabela 3	Relação da presença de alelos nulos em seis <i>loci</i> de microssatélites em seis populações e para <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> da Serra da Mantiqueira.	53
Tabela 4	Parâmetros de diversidade genética de seis populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> das bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul, utilizando-se os genótipos sem o ajuste do programa MICRO-CHECKER	54
Tabela 5	Parâmetros de diversidade genética de seis populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> das bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul, utilizando-se os genótipos sem o ajuste do programa MICRO-CHECKER	55
Tabela 6	Taxa de migração ($m_{i \rightarrow j}$) e a taxa de migração escalada pela taxa de mutação ($m_{i \rightarrow j}$) entre seis populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> da Serra da Mantiqueira.	61
Tabela 7	Tamanhos efetivos populacionais (N_e) fornecidos pelo <i>software</i> MIGRATE e Probabilidades do teste de Wincoxon (P_{WT}), segundo o modelo de mutação de duas fases (<i>two-phased model</i> - TPM), para testar o excesso de heterozigidade, fornecidas pelo <i>software</i> BOTTLENECK, para seis populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> da região da Serra da Mantiqueira.	61
Tabela 8	Valores de diversidade genética e de teste de neutralidade seletiva de ATPase e COI para seis populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> da	63

Serra da Mantiqueira.

- Tabela 9** Valores da variação genética de três marcadores (Microsatélites, COI e ATPase) obtidos através da AMOVA sob duas hipóteses de hierarquização dos dados (Bacia do Sapucaí e do Paraíba do Sul e grupos – CP+PE+LV+RG, LC e RP). **63**
- Tabela 10** Média das heterozigosidades observadas e esperadas (acima) e valores de variação (abaixo) e número de alelos de cinco trabalhos que utilizaram populações de *Astyanax* como modelos de estudos populacionais. **76**

LISTA DE ABREVIATURAS

COI	Citocromo C Oxidase I
ATPase	Adenosinatrifostase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
K2P	Kimura 2 Parâmetros
AMOVA	Análise da Variância Molecular
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SSRs	<i>Simple Sequences Repeats</i> - Microssatélites
CP	População Coletada no Córrego das Pedras
PE	População Coletada no Córrego Perdizes
LC	População Coletada no Lago Capivari
LV	População Coletada no Córrego Lavrinhas
RG	População Coletada no Ribeirão Grande
RP	População Coletada no Ribeirão Pequeno
PCoA	<i>Principal Coordinate Analyzes</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
TPM	Modelo de evolução de <i>loci</i> de microssatélites <i>two-phased model</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ANA -	Agencia Nacional de Águas
LabGEv	Laboratório de Genética Evolutiva

LCP	Laboratório de Citogenética de Peixes
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
MMA	Ministério do Meio Ambiente
SISBio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SRC	Sistema de Referência por Coordenada
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
RPM	Rotações por Minuto
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FAM	Amidita de fluoresceína
NED	N-(1-naftil)etilenodiamina
ESS	<i>Effective Sample Sizes</i>
ENA	<i>Excluding Null Alleles</i>

LISTA DE SIGLAS

H_O	Heterozigosidade Observada
H_E	Heterozigosidade Esperada
N_E	Número Efetivo de Alelos
N_e	Tamanho Efetivo Populacional
A_R	Riqueza Alélica
N_{AP}	Número de Alelos Privados
N_A	Número de Alelos
F_{IS}	Índice de endogamia
F_{ST}	Diferença via AMOVA entre todos os níveis menos inclusivos
F_{CT}	Diferença via AMOVA entre os níveis mais inclusivos
F_{SC}	Diferença via AMOVA entre os níveis menos inclusivos de um mesmo grupo
P_{WT}	Probabilidades do teste de Wincoxon
MZUEL	Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina
NUP	Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá

LISTA DE SÍMBOLOS

- $m_{i \rightarrow j}$ Taxa de Migração da População i para a População j
- $M_{i \rightarrow j}$ Taxa de Migração Escalada Pela Taxa de Mutação da População i para a população j
- h Diversidade Haplotípica
- π Diversidade nucleotídica

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 Variabilidade Genética e sua Importância na Conservação dos Peixes Neotropicais	24
2.2 Estudos Filogeográficos e sua Importância na Conservação dos Peixes Neotropicais	27
2.3 O Gênero <i>Astyanax</i> e o “Complexo” <i>A. scabripinnis</i>	28
2.4 A Serra da Mantiqueira e a Evolução Geológica da Paisagem do Planalto de Campos do Jordão	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização da Área de Coleta	36
4.2 Coletas	38
4.3 Extrações de DNA	41
4.4 Seleção de Marcadores e Amplificação dos <i>Loci</i> de Microssatélites	42
4.5 Amplificação dos Fragmentos de DNA mitocondrial	44
4.6 Análises Estatísticas para Microssatélites	45
4.7 Análises Estatísticas para os Fragmentos de DNA Mitocondrial	49

5 RESULTADOS	52
5.1 Análises com Microssatélites	50
5.2 Análises com DNA Mitocondrial	62
6 DISCUSSÃO	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8 REFERÊNCIAS	91
ANEXO A - Licença permanente para coleta de material zoológico (Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni)	111
ANEXO B - Aprovação do protocolo de pesquisa pela Sub-Comissão de Ética em Animais-UEPG	113

1 APRESENTAÇÃO

O conhecimento da diversidade genética das populações naturais é considerado um dos três níveis fundamentais para a conservação da biodiversidade, juntamente com a diversidade de espécies e de ecossistemas. O Brasil, sendo parte da região que concentra a maior biodiversidade do mundo, sempre despertou o interesse da comunidade científica, bem como essa enorme biodiversidade pôde fornecer modelos de estudos para se entender os mecanismos evolutivos dos seres vivos. Esse interesse atingiu, por exemplo, dois dos maiores naturalistas da história, Alfred Russel Wallace¹ e Charles Darwin², que durante seus trabalhos de campo, coletaram no Brasil uma grande quantidade de amostras.

Dentre os principais modelos para o entendimento desses fenômenos estão as populações naturais de peixes. Assim como para diversos outros táxons, o Brasil abriga a maior diversidade ictiológica do planeta, distribuída em grandes bacias continentais e litorâneas, nos mais diversificados tipos de ambientes, onde também encontram-se inúmeras áreas de endemia.

Um dos principais modelos de estudos genéticos são os peixes de cabeceiras. Por habitarem regiões isoladas, com pequenos volumes de água - o que as torna mais susceptíveis a variações ambientais - e por vezes antropizadas, despertam o interesse da ciência. Por diversos meios diferentes, busca-se entender os mecanismos intrínsecos que as permitem resistir às pressões externas e manter-se existindo ao longo do tempo. Nessa linha, é de suma importância conhecer os fatores genéticos não só atuais, como os níveis de heterozigidade e diversidade alélica, mas também históricos, como fundação das populações (colonização de ambientes), eventos de dispersão e/ou vicariância, padrões de migração, entre outros.

Um desses modelos, bastante estudado, são as populações de *Astyanax aff. scabripinnis*³ da região da Serra da Mantiqueira. Desde o início da década de 1990, esses peixes têm sido usados para se entender diferentes mecanismos evolutivos e seu *status* de conservação tem sido

1 Alfred Russel Wallace (1823 - 1913) viajou para o Amazonas em 1848. De volta à Inglaterra publicou *A Narrative of Travels on the Amazon and Rio Negro*, em 1853 (WALLACE, 1939)

2 Charles Darwin (1809 – 1882) coletou o holótipo de *Astyanax scabripinnis* no Rio de Janeiro em 1832, descrito por Jenys em 1842 como *Tetragonopterus scabripinnis* e transferido por Eigenmann em 1910 para o gênero *Astyanax*.

3 Por diversas questões que serão discutidas posteriormente, decorrentes das incertezas taxonômicas relacionadas ao grupo, adotou-se nesse trabalho a nomenclatura *Astyanax aff. scabripinnis*.

acessado, principalmente com marcadores citogenéticos, e em geral, enorme diversidade genética tem sido revelada.

Contudo, a Ciência Brasileira ainda carece de conhecimento dessas populações que possam descrever com marcadores diferentes e, talvez mais sensíveis, as condições de conservação genética dessas populações e alguns processos históricos, como a colonização da região, por exemplo.

Este trabalho apresenta um estudo utilizando marcadores baseados em microssatélites e em DNA mitocondrial, abordagem até então inédita para *A. aff. scabripinnis* dessa região, visando conhecer de forma mais aprofundada, as condições de conservação dessas populações, os padrões de estruturação e fluxo gênico e os fatores históricos, tais como a colonização da região relacionada aos processos de formação geológica da Serra da Mantiqueira.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Variabilidade Genética e sua Importância na Conservação dos Peixes Neotropicais

Segundo Frankham, Ballou e Briscoe (2008) a manutenção da diversidade genética de uma população é essencial para sua conservação. A redução desta diversidade está relacionada à diminuição do potencial evolutivo e pode aumentar os níveis de endogamia dessas populações, levando, por consequência, a um maior risco de extinção. A fragmentação de habitats, poluição, introdução de espécies exóticas e eventos estocásticos podem pressionar as populações, reduzindo seu tamanho e sua diversidade genética. Esses fatores são particularmente ameaçadores para populações de peixes que possuem uma capacidade de migração limitada ou até mesmo inexistente.

Estudos genéticos populacionais em peixes, utilizando uma série de marcadores, têm sido amplamente utilizados para o levantamento de informações relevantes do *status* de conservação dessas espécies. Classicamente, um dos primeiros marcadores a serem utilizados e que sempre resultou em boas respostas evolutivas, foram marcadores baseados em proteínas, onde destacam-se as isoenzimas. Desde a década de 90 e início dos anos 2000, estes marcadores têm sido usados para melhor compreender a divergência genética entre populações de peixes das bacias brasileiras. Revaldaves et al. (1997) trabalhando com 19 sistemas enzimáticos em *Prochilodus lineatus* da bacia do Rio Paraná, visualizaram baixíssima diferenciação genética nas três populações estudadas. Vinte anos mais tarde, utilizando marcadores com maior capacidade resolutiva (microsatélites e DNA mitocondrial), Ferreira et al. (2017), obtiveram resultados semelhantes, porém foram capazes de inferir que o tempo de separação, ocasionado pela construção de barragens ao longo do rio não foi suficiente para estruturar as populações, devido à alta capacidade migratória de *P. lineatus*.

Menos variáveis do que marcadores baseados em DNA, isoenzimas demonstraram-se eficientes no estudo de populações de peixes, principalmente ao investigar estruturação genética mais antiga. Peres et al. (2002) foram capazes de identificar diferenças significativas entre populações de *Hoplias malabaricus* em lagoas temporárias e do canal principal na bacia de inundação do Rio Paraná e um alto déficit de heterozigotos. Para mesma espécie, porém de outra bacia hidrográfica, Gondim et al. (2010), utilizando microsatélites, encontrou valores de fixação gênica bastante semelhantes, demonstrando também grande o déficit de heterozigotos.

Com o estabelecimento de novos marcadores baseados em DNA e com a evolução das técnicas de utilização desses marcadores, diversos laboratórios no Brasil passaram a realizar estudos, aplicando-os amplamente a fauna Neotropical. Neste cenário, destacam-se os marcadores baseados em microssatélites (CHAUHAN e RAJIV, 2010). Quando aplicados ao estudo de populações de peixes, são úteis para a identificação de estoques, construção de mapas gênicos, seleção caracteres economicamente importantes, identificação de unidades evolutivas independentes, enfim, são enormemente aplicáveis à conservação (CHISTIAKOV, HELLEMANS e VOLCKAERT, 2006). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), nos anos 80 diversos trabalhos descreveram a ocorrência de regiões altamente repetitivas (os microssatélites) no genoma de diversos organismos eucariotos.

Contudo, foi somente no início dos anos 2000 que trabalhos que empregavam microssatélites no estudo de populações naturais de peixes começaram a surgir no Brasil. Estes trabalhos preferencialmente utilizavam peixes de grande interesse econômico, tais como o curimatá *Prochilodus* spp, (HATANAKA et al., 2002), o pacu *Piaractus mesopotâmicos* (CALCAGNOTTO, RUSSELLO e DESALLE, 2001) e a piabanha *Brycon opalinus* (BARROSO et al., 2003).

Posteriormente, alguns desses trabalhos foram aplicados à conservação de espécie do gênero *Astyanax*. Dentre esses, pode-se citar trabalhos de descrição de variabilidade genética, utilizando marcadores RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), hoje considerados obsoletos devido a serem marcadores dominantes e não evidenciarem os heterozigotos. Embora pouco utilizada hoje, esta técnica foi capaz de demonstrar diferentes graus de similaridade genética entre populações. Por exemplo, Paiva (2001) que sugeriu que populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* sofreram isolamento após a construção de uma usina hidrelétrica. Leuzzi et al. (2004) encontraram diferenças populacionais em *A. altiparanae*, entre três trechos do Rio Paranapanema. Este trabalho demonstrou a necessidade de se conservar não só a espécie, como também as populações, já que são geneticamente distintas. Também em 2004, Matoso e colaboradores encontraram um alto nível de variação genética em *Astyanax* sp (*A. aff. fasciatus*) entre três populações coletadas em três pontos da bacia do Rio Tibagi e no sistema de furnas. Além disso, uma das populações demonstrou um alto índice de similaridade genética, processo provavelmente causado por deriva genética, segundo os autores. Sofia et al. (2006) coletaram *Astyanax scabripinnis* em um corpo d'água em região urbana no Paraná. As análises com marcadores de RAPD mostraram pequenas distâncias genéticas entre os pontos amostrados, mas também baixo fluxo gênico entre eles. Segundo os autores, a população está passando por

um processo de diferenciação genética. Pamponet et al. (2008) também utilizando RAPD, encontraram dados que permitiram concluir que há estruturação nas populações de *Astyanax bimaculatus* estudadas na bacia do Rio de Contas, BA. Dados morfométricos, merísticos e citogenéticos foram incapazes de demonstrar diferenciação entre estas populações, o que foi evidenciado somente pelos dados moleculares.

Mais recentemente, marcadores de microssatélites (*Simple Sequences Repeats* - SSRs) têm se mostrado extremamente eficientes em estudos populacionais. Strecker (2003) desenhou seis oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites que considerou efetivos na determinação da variabilidade de *Astyanax fasciatus* (descrito dessa forma, mas provavelmente *A. mexicanus*). Destes, quatro *loci* amplificados foram considerados de alto polimorfismo, enquanto dois foram considerados de médio polimorfismo. No mesmo, ano Strecker et al. (2003), utilizando os mesmos *loci* e também dados de DNA mitocondrial, estudaram oito populações de *A. mexicanus* (quatro de superfície e quatro de caverna). Os microssatélites não revelaram fluxo gênico entre as populações e os marcadores mitocondriais foram eficazes em determinar origens semelhantes para as populações de cavernas. Em um estudo utilizando dois marcadores moleculares (RAPD e ISSR) e objetivando analisar a estrutura populacional de *A. fasciatus*, Pazza et al. (2007) encontraram resultados mais precisos para ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) do que para RAPD, que mostraram-se mais eficientes no estudo das populações em questão. Hausdorf et al. (2011) utilizando os iniciadores descritos por Strecker (2003a), analisaram a estruturação populacional de *Astyanax* (não citaram a espécie, provavelmente *Astyanax mexicanus*) no México. Neste trabalho os marcadores moleculares baseados em microssatélites funcionaram de modo eficiente para constatar a existência de barreiras geográficas que impedem o fluxo gênico entre estas populações. Um trabalho que demonstra a alta eficácia de microssatélites para *Astyanax*, foi realizado por Bradic et al. (2012) também na espécie *A. mexicanus*. Neste trabalho, 21 populações desses peixes foram estudadas (11 de caverna e 10 de superfície) com 26 *loci* de microssatélites. Os autores conseguiram determinar diferenças significativas entre as populações de superfície e de caverna utilizadas, bem como levantar dados que permitiram conhecer o *status* de conservação de cada uma delas. Por exemplo, afirmaram os autores que populações de caverna possuem pelo menos cinco origens evolutivas distintas a partir de populações de superfície. Outra informação relevante para a conservação, é que populações de caverna apresentam menor variabilidade genética e menor número efetivo populacional.

Estes estudos sobre variabilidade genética em *Astyanax* demonstram que marcadores de

microsatélites geram resultados bem significativos e são capazes de determinar padrões de estruturação populacional, ocorrência ou não de fluxo gênico, índices de similaridade genética, tamanho efetivo das populações, gargalos populacionais, entre outros parâmetros. No entanto, estudos dessa natureza são escassos com as populações de *A. scabripinnis* e inéditos com as populações dessas espécies da região das Serras da Mantiqueira e do Mar, que são objeto deste trabalho.

2.2 Estudos Filogeográficos e sua Importância na Conservação dos Peixes Neotropicais

O termo “Filogeografia”, proposto pela primeira vez por Avise et al. (1987), refere-se à análise filogenética de um organismo no contexto de sua distribuição geográfica (HICKERSON et al., 2010). Ainda segundo Avise et al. (1987), a filogeografia pode ajudar a elucidar os mecanismos que levaram as espécies à especiação, bem como os eventos geológicos, geográficos ou climatológicos que geraram a distribuição da biodiversidade.

Os estudos filogeográficos partem do pressuposto que as populações biológicas são estruturadas e cada evento que levou as populações à essa estruturação deve gerar uma marca genética distinta (TEMPLETON, 1998; AVISE, 2000). Uma análise filogeográfica adequada pode identificar, por exemplo, padrões de isolamento (e o que causam esse isolamento), padrões de fluxo gênico, a ocorrência ou não de migração, ocorrência de hibridação, ocorrência de introgressão, entre outros. Entretanto, segundo Hickerson et al. (2010), a mais importante pergunta que a filogeografia pode responder é: “o que é espécie?”. Essa pergunta tem várias respostas e muitas delas levam em consideração conceitos filogeográficos, o que parece ser bastante apropriado para peixes.

Sob essa óptica, a filogeografia tem aparecido como uma importante ferramenta para resolver problemas de taxonomia dos peixes da região neotropical. Sabe-se que essa é a região que possui a mais diversificada ictiofauna de água doce do planeta, com um número que pode ultrapassar 6.000 espécies (REIS et al., 2003; NELSON, 2016). Agrava-se este problema com a existência de um número grande de complexos de espécies, ou seja, a existência de um grupo taxonômico, com características morfológicas semelhantes, cujos exemplares são descritos como membros da mesma espécie, mas sabe-se que devido à grande diversidade ainda faltam informações que permitam separá-las em espécies diferentes. Exemplos desses complexos são *Astyanax scabripinnis*, *A. fasciatus*, *Hypostomus ancistroides*, *Synbranchus marmoratu*,

Hoplias malabaricus, entre outros. É provável que os frequentes estudos taxonômicos, utilizando marcadores morfológicos ou moleculares, possam ajudar a elucidar parte desse problema e embasar a descrição de espécies novas.

Neste contexto a filogeografia tem ajudado a elucidar alguns problemas relacionados à ictiofauna da região neotropical. Como exemplo podemos citar o trabalho de Borba et al. (2013) que testaram a hipótese de ocorrência de espécies crípticas de *Hypostomus strigaticeps* na bacia do Alto Rio Paraná utilizando as subunidades 6 e 8 do gene mitocondrial ATPase (ATPase 6/8). Hubert et al. (2007), também com marcadores de DNA mitocondrial, conseguiram definir uma origem monofilética para o gênero *Serrasalmus*. Além disso, puderam definir a ocorrência de alguns eventos vicariantes e encontraram até indícios de especiação simpátrica. Strecker et al. (2004) com populações de superfície e de cavernas de *Astyanax mexicanus*. O trabalho determinou as rotas de fluxo gênico entre as populações analisadas e concluiu que a taxonomia aplicada tradicionalmente não condiz com os resultados obtidos. Marreta (2011) conseguiu identificar duas possíveis origens distintas para *Astyanax* na bacia do Alto Rio Paraná, uma envolvendo *A. altiparanae* e outra *A. paranae*, sendo que esta última não forma uma unidade monofilética nesta bacia. Os mesmos dados filogeográficos levantados por Marreta suportaram a ocorrência de mais cinco espécies crípticas dentro do grupo *A. paranae*. O grupo *A. altiparanae* também foi objeto de estudo de Kavalco et al. (2011). Os autores realizaram uma análise da estrutura cariotípica comparada com uma análise filogeográfica e encontraram dados que relacionam as duas.

Essa breve revisão da literatura mostra que estudos genético-populacionais ou filogeográficos de peixes neotropicais, embora em franca expansão, ainda necessitam serem ampliados, quando se leva em conta a enorme diversidade desta região. Muito há para ser conhecido, sobre as entidades biológica aqui viventes, especialmente sobre o gênero *Astyanax*.

2.3 O Gênero *Astyanax* e o “Complexo” *A. scabripinnis*

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 cujos representantes são conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, é considerado um dos mais especiosos dentre os caracídeos *incertae sedis* (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Nos últimos dez anos, o número de espécies descritas vem aumentando consideravelmente. Por exemplo, o *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*, publicado no início dos anos 2000,

considerava 86 espécies válidas (LIMA et al., 2003). Em 2015, o *Catalogue of Fishes* (*California Academy of Sciences*) considerava 147 espécies válidas para *Astyanax* (ROSSINI et al., 2016).

A região de distribuição do gênero *Astyanax*, vai do sul dos Estados Unidos até a bacia do Rio da Prata, na Argentina. São, portanto, endêmicos de corpos d'água dessa região (EIGENMANN, 1921; GÉRY, 1977; WEITZMAN e FINK, 1983) ocorrendo nos mais variados ambientes, tais como cabeceiras pequenos riachos, leito de rios de grande porte, rios costeiros, lagos naturais ou artificiais, entre outros.

Britski et al. (1988) caracterizou morfologicamente o gênero *Astyanax* por apresentar tamanho reduzido, nadadeira adiposa geralmente presente, linha lateral completa e um pouco curva na frente, pré-maxilar não protátil, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes, escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal. Posteriormente, outras revisões, demonstraram que, para certas espécies de *Astyanax*, algumas características, tais como a dentição não são indicadas para estudos de taxonomia (ZANATA, 1997). De acordo com Melo (2001), os estudos filogenéticos, baseados em morfologia, têm demonstrado a dificuldade dos pesquisadores em elencar características que definam o gênero *Astyanax*, o que demonstra que provavelmente o gênero não é monofilético. Posteriormente, diversos outros estudos de filogenia molecular e morfológica corroboraram essa hipótese (JAVONILLO et al., 2010; MIRANDE, 2010, OLIVEIRA et al., 2011). Destaca-se também nesse gênero a presença de diversas espécies que possuem características em comum, os denominados complexos de espécies.

A enorme diversidade de *Astyanax* pode também ser evidenciada em relação ao cariótipo. O gênero possui considerável variação do número de cromossomos, sendo $2n = 50$ o número modal considerado para este gênero (OLIVEIRA et al., 1988, KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). O número diploide, entretanto, varia consideravelmente entre as diversas populações do gênero. Por exemplo, Morelli et al. (1983) encontram $2n = 36$ em *A. schubarti* do Rio Mogi-Guaçu e $2n = 50$ em *A. paranae* (descrito por eles como *A. scabripinnis paranae*) no Rio Bicudos, Brotas-SP.

Variações nos números fundamentais e nas fórmulas cariotípicas também são frequentes, assim como polimorfismo de blocos heterocromáticos e nas localizações das regiões organizadoras do nucléolo (MANTOVANI et al., 2000; TORRES-MARIANO e MORELLI, 2006; PAZZA et al., 2006 e 2007; VICARI et al., 2008; KAVALCO, 2008; MEDRADO et al., 2008; KAVALCO et al., 2009; HASHIMOTO e PORTO-FORESTI, 2010). São evidentes

também variações do número fundamental no cariótipo desses peixes, podendo ser encontrados 68, 70, 80, 82, 84, 86, 88, 72, 92, 94 e 96 (MIZOGUCHI et al., 1998; MAISTRO et al., 1998; MANTOVANI et al., 2000; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; DOMINGUES et al., 2007; PAMPONET et al., 2008; KANTEK et al., 2008; FAVA, 2008; FERREIRA-NETO et al., 2009; ROSA et al., 2009; PACHECO et al., 2010; KAVALCO et al., 2010). A presença de cromossomos supranumerários (também conhecidos como Bs), também tem sido retratada, em números bastante variáveis.

Esta diversidade tem propiciado a caracterização de diferentes complexos de espécies nesse gênero, e um dos mais emblemáticos é o complexo *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991 - figura 1). Estes peixes são particularmente interessantes porque formam populações isoladas em cabeceiras de riachos apresentando grande variação cariotípica, ampla distribuição geográfica (do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul) e, frequentemente, cromossomos adicionais em seu cariótipo (supranumerários) conhecidos por cromossomos B (revisado em MOREIRA-FILHO et al., 2004).



Figura 1 – Exemplar de *A. aff. scabripinnis* coletado na região da Serra da Mantiqueira

A descrição desta espécie foi feita por Leonard Jenyns em 1842 a partir de um único exemplar coletado por Darwin no Rio de Janeiro pela expedição do navio HMS Beagle (BERTACO e LUCENA, 2006). Inicialmente, foi descrita *Tetragonopterus scabripinnis*, sendo posteriormente transferida para o gênero *Astyanax* por Eigenmann em 1910. Melo (2001) revisou as espécies de *Astyanax* na Serra do Órgãos e embora esta seja a localidade tipo, não encontrou nenhuma população com as mesmas características do holótipo de *A. scabripinnis*, o que sugere

que esta seja uma espécie já extinta (BERTACO e LUCENA, 2006), já que a localidade fora bastante modificada desde a coleta dos exemplos pelas atividades antrópicas.

Muitos trabalhos têm atribuído o nome *Astyanax scabripinnis* a espécimes coletados em cabeceiras de riachos de pequeno porte, que frequentemente apresentam a combinação de caracteres típicas dessa espécie (ABILHOA, 2007), mesmo em corpos d'água mais interioranos. Segundo Bertaco e Lucena (2006) este complexo é composto por aproximadamente 15 espécies, mas quando se leva em conta caracteres citogenéticos, vê-se que esse número pode estar subestimado.

Recentemente, Oliveira (2017) revisou o complexo *Astyanax scabripinnis* redescrivendo a espécie. Segundo o autor, sua ocorrência é da região litorânea, desde o Uruguai até o Espírito Santo e no Rio Iguaçu, com duas sinonímias: *A. laticeps* e *A. serratus*. Desta forma, propõe que, na verdade, *A. scabripinnis* está segura quanto ao seu status de conservação e a separação das espécies contidas no complexo.

Estudos citogenéticos de *A. scabripinnis* são relativamente comuns. Vicari et al. (2008) identificaram três constituições cariotípicas estudando cinco populações diferentes de *Astyanax* e sugeriram que duas delas pertencem ao complexo *A. scabripinnis* e a terceira a *A. paranae*. Castro et al. (2014) estudaram cinco populações desta espécie, três da região da Serra da Mantiqueira e uma em Maringá/PR, usando morfometria, marcadores citogenéticos e mitocondriais para reconstrução filogenética. Encontraram diferenças significativas entre as populações, mas uma origem comum para todas elas. Barbosa et al. (2015) encontraram regiões de DNA repetitivos, regiões codificadoras e não codificadoras em proximidade, o que, sugerem os autores, estar envolvido com a ação dos retrotransposons.

Diversos outros estudos se dedicaram a aprofundar os conhecimentos sobre as populações de *A. aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira, as mesmas estudadas nesse trabalho. Em geral, essas populações apresentam número diploide de 50 cromossomos, distribuídos em seis metacêntricos, 22 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos. Muitas delas apresentam cromossomos supranumerários (cromossomos Bs), sendo encontrados em frequências que variam de nenhuma até dois. Interessantemente, duas populações diferentes no mesmo ribeirão, conhecido como Ribeirão Grande e que ocorrem em duas altitudes (700 metros e acima de 1800 metros) apresentam constituições cromossômicas diferentes. Embora a fórmula cariotípica seja a mesma, a população de menor altitude não possui cromossomos Bs e regiões organizadoras do nucléolo viando em número de zero a nove, enquanto que a população de maior altitude apresenta de zero a dois cromossomos Bs e uma ou

duas regiões organizadoras do nucléolo (revisado em KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). Desde a década de 1980, muitos outros estudos com marcadores citogenéticos vem utilizando populações de *A. aff. scabripinnis* tanto da Serra da Mantiqueira quanto de outras regiões.

Ao contrário dos estudos com marcadores citogenéticos, poucas vezes marcadores moleculares, tanto nucleares quanto mitocondriais, ainda são pouco utilizados para entender a diversidade de *A. scabripinnis*. Dentre eles, pode-se citar o estudo de populações de um córrego urbano utilizando RAPD (SOFIA et al. 2006) e a utilização de marcadores moleculares para a reconstrução filogenética de populações da Serra da Mantiqueira e do interior do Paraná (Castro et al. 2014). *A. scabripinnis* nunca foi estudado com marcadores baseados em microssatélites, nem tampouco através da combinação destes com marcadores mitocondriais baseados em sequenciamento.

A ampla distribuição do gênero *Astyanax* bem como do complexo *Astyanax scabripinnis*, a acentuada variação genética (confirmada até o momento por dados citogenéticos e alguns trabalhos com dados moleculares) e a presença frequente de cromossomos supranumerários, fundamenta a utilização desses animais como modelos de estudos evolutivos. As evidências do parentesco evolutivo e a distribuição geográfica compartilhada entre as espécies do complexo, bem como a possibilidade de ser uma espécie já extinta, fundamenta a necessidade do levantamento de dados que considerem a variabilidade genética e a distribuição filogeográfica destes peixes.

2.4 A Serra da Mantiqueira e a Evolução Geológica da Paisagem do Planalto de Campos do Jordão

A Serra da Mantiqueira é uma cadeia de montanhas formada por rochas cristalinas, orientação Sudeste-Noroeste e que encontra-se entre os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (INGENITO e BUCKUP, 2007). A grosso modo, pode-se dizer que sua origem está associada a movimentos tectônicos do cretáceo inferior, cerca de 70 milhões de anos atrás (MODENESI-GAUTTIERI, HIRUMA e RICCOMINI, 2002). Contudo há evidência de atividade tectônica mais recente. Segundo Hiruma, Riccomini e Modenesi-Gauttieri (2001) a elevação final da Serra da Mantiqueira teria ocorrido durante o quaternário, período que se iniciou a 1,8 milhão de anos atrás e se estende até o presente. Ao longo da serra, encontram-se superfícies planas provenientes de erosões antigas, como o planalto de Campos de Jordão, entre

os estados de São Paulo e Minas Gerais, e de Itatiaia, no estado do Rio de Janeiro (Soares, 2005).

Ingêxito e Buckup (2007) estudaram o potencial da Serra da Mantiqueira como barreira biogeográfica para ictiofauna entre as bacias dos Rios Paraíba do Sul e alto Paraná. Encontraram a coexistência de espécies em ambas as bacias, entre elas uma do grupo *Astyanax scabripinnis* (identificado como *Astyanax* sp.1). Concluíram que a serra funciona eficientemente como barreira entre as faunas de ambas as bacias e, como a pesquisa foi em nível específico e não populacional, não identificaram diferenças dentro das bacias.

A ictiofauna do Rio Paraíba do Sul também foi caracterizada e estudada por outros trabalhos. Bizerril (1998) identificou na bacia regiões de endemismo, introdução de espécies e alguns possíveis pontos de captura de cabeceira.

O planalto de campus do Jordão tem aproximadamente 810 Km² (MODENESI-GAUTTIERI, 1998) e altitudes que chegam a mais 2.000 metros (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998). É limitado por escarpas abruptas que se erguem a aproximadamente 1500 metros do vale do Paraíba do Sul (MODENESI-GAUTTIERI e HIRUMA, 2004), constituídas por falhas transcorrentes direcionadas a noroeste: a Falha do Jundiuvira e a Falha do Paiol Grande (HASUI et al., 1978). Com relação ao clima, as temperaturas médias anuais são de 14,3°C e precipitação média anual de 1205 a 2800 milímetros, com concentração de 80 % das chuvas nos períodos de outubro a março e incidência de até seis meses com concentração de chuvas inferiores a 2 %. Eventos de geadas, também são muito frequentes no inverno, variando de 9 a 70 dias no ano. Contudo as faces norte e sul-sudeste apresentam diferenças acentuadas com relação ao clima, a primeira é constituída de encostas ensolaradas relativamente secas, enquanto a segunda possui encostas sombrias e mais úmidas. Isso ocorre pois a face sul está diretamente exposta às frentes polares úmidas (MODENESI-GAUTTIERI e HIRUMA, 2004).

Com relação à paisagem, o clima de altitude e a evolução quaternária, moldaram um sistema de altos campos, caracterizada pela distribuição da vegetação em uma espécie de mosaico entre mata e campo (MODENESI, 1988). São comuns nessa região a presença de diversos bosques com diferentes dosséis entremeados por regiões vegetação rasteira. Corpos d'água com diferentes ordens de grandeza são também muito comuns, inclusive com a ocorrência de quedas e lagos artificiais.

Há evidências de um tectonismo recente (cerca de 10 mil anos) na região do planalto de Campos do Jordão (HIRUMA, RICCOMINI e MODENESI-GAUTTIERI, 2001), tanto na face sul, onde está a bacia do Paraíba do Sul, quanto na face norte, onde está a bacia do Sapucaí

(DEROIN e DEFFONTAINES, 1995). Dentre as modificações recentes do relevo, estão eventos como a formação de cristas e escarpas truncadas, divisores pouco nítidos, capturas de drenagem (ou de cabeceiras) e os *stutter ridges*, que são cumes que se movem ao longo de falhas modificando as drenagens.

A Serra da Mantiqueira ocorre inteiramente dentro do domínio da Floresta Atlântica (figura 2), uma das maiores florestas úmidas do mundo e um dos mais importantes pontos de biodiversidade do planeta. Originalmente, a Floresta Atlântica cobria cerca de 150 milhões de hectares (RIBEIRO et al., 2009), porém apenas 7 % da cobertura original ainda resta hoje e está severamente ameaçada, principalmente pelo elevado grau de fragmentação e por estar entre as nas regiões mais populosas do Brasil (TABARELLI et al., 2005).

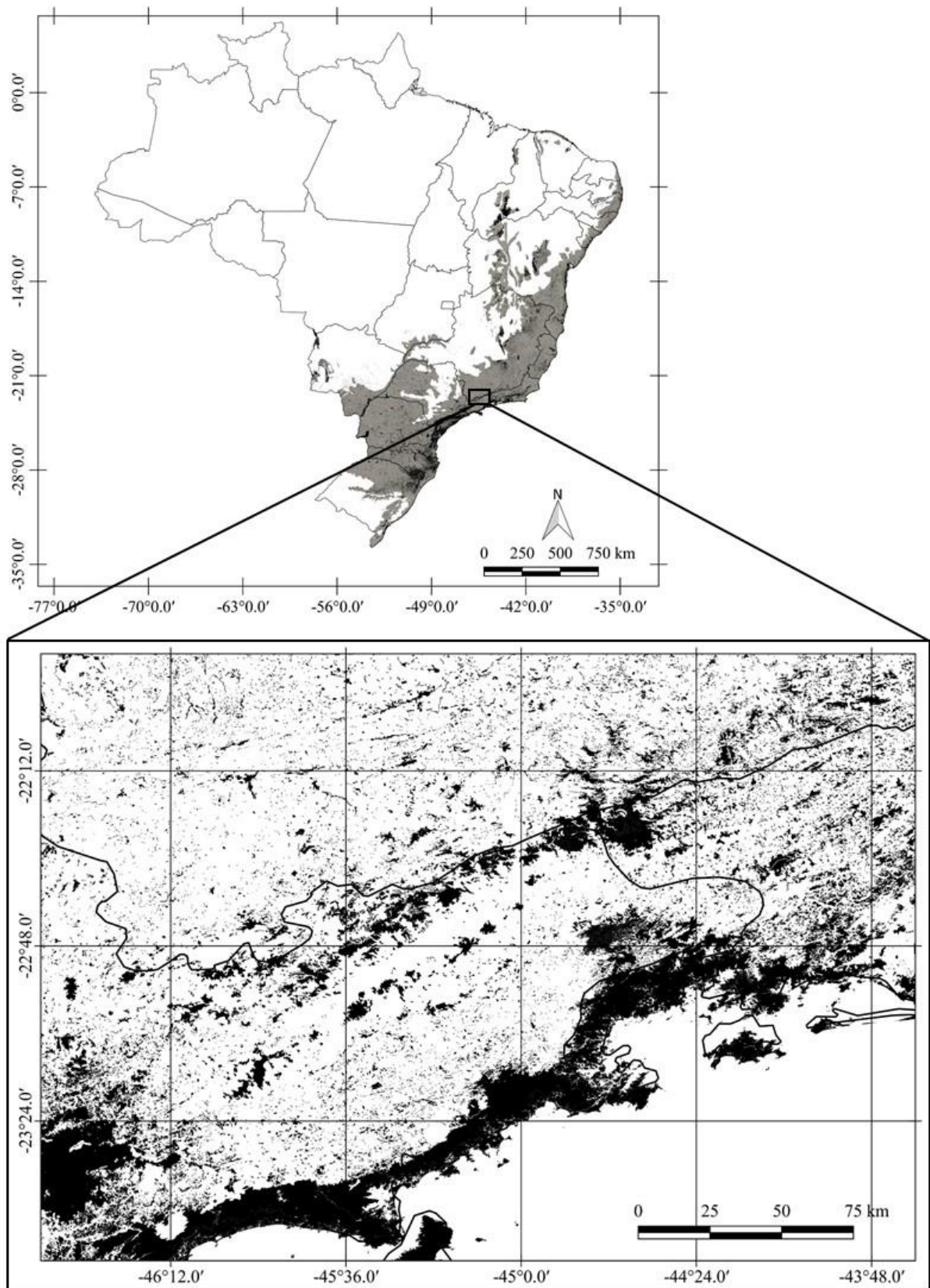


Figura 2 – Domínio da Floresta Atlântica em cinza (a) e remanescentes da Floresta Atlântica em preto (b), destacando o alto grau de fragmentação da região da Serra da Mantiqueira. Fonte: SOS Mata Atlântica. Disponível em <http://mapas.sosma.org.br/dados/#>. Acesso: 16/01/2018.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar a diversidade genética de amostras populacionais de *Astyanax* aff. *scabripinnis* das bacias do Rio Sapucaí-Grande-Alto Paraná e Rio Paraíba do Sul na região do divisor de águas da Serra da Mantiqueira.

3.2 Objetivos Específicos

Testar, através de ferramentas moleculares, se a origem comum das populações usadas nesse trabalho.

Testar a transferibilidade de marcadores moleculares baseados em microssatélites descritos para outras espécies de *Astyanax* para as populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da região da Serra da Mantiqueira.

Conhecer os níveis de diversidade genética intra e interpopulacionais e compará-los com outras populações congêneres ou biologicamente semelhantes, para aprofundar o conhecimento sobre seus *status* de conservação.

Identificar os possíveis padrões de estruturação, testando hipóteses inferidas através da observação dos padrões geográficos e genéticos. A primeira hipótese a ser testada será a Serra da Mantiqueira como barreira biogeográfica entre as populações de *A.* aff. *scabripinnis*; posteriormente, outras hipóteses, inferidas a partir da observação dos padrões genéticos resultantes de diversas análises computacionais, serão testadas. A partir dos padrões de estruturação testados, identificar se há e como são os padrões de fluxo gênico e a importância deste para a manutenção da variabilidade genética.

Realizar um estudo filogeográfico das populações em questão com marcadores baseados em DNA mitocondrial (COI e ATPase) relacionando os resultados com os eventos de formação geológica da paisagem, afim de se tentar entender como se deu a colonização histórica da região.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Área de Coleta

O Rio Sapucaí, tributário do Rio Grande e pertencente a Região Hidrográfica do Paraná, tem suas nascentes na face norte da Serra da Mantiqueira, no estado de São Paulo e corre em direção noroeste entrando no estado de Minas Gerais onde deságua no Rio Grande. O Rio Grande, por sua vez, é um importante afluente da margem esquerda do Rio Paraná (SAADI, 1991). Segundo dados do IBGE, o Alto Rio Sapucaí compreende uma área de drenagem de 2.947,06 km², dos quais 360,03 km² estão no estado de São Paulo e 2.587,03 km² no estado de Minas Gerais. A bacia abrange 17 municípios, totalizando cerca de 300 mil habitantes.

A bacia do Rio Paraíba do Sul, integrante da Região Hidrográfica do Atlântico Sudeste, abrange uma área de aproximadamente 57.000 km², estando inserida entre os maiores centros urbanos e industriais do país e abastece cerca de 15 milhões de pessoas (SOARES, 2005). Ao norte seu divisor de águas se faz entre a bacia do Rio Grande (tributário do Rio Paraná) e a bacia do Rio Doce (sistema do leste brasileiro) por intermédio da Serra da Mantiqueira. Ao sul, a Serra do Mar separa esta bacia de diversos pequenos rios que fluem diretamente para o Oceano Atlântico. A bacia do Rio Paraíba do Sul é formada pela confluência de duas bacias: a do Rio Paraíba e do Rio Paraitinga, sendo que as cabeceiras dessas bacias estão isoladas pela Serra do Quebra-Cangalha e Serra do Mar (BIZERRIL, 1998; SOARES, 2005).

4.2 Coletas

De acordo com o que fora apresentado anteriormente, devido às incertezas taxonômicas, adotou-se a nomenclatura para a entidade evolutiva utilizada nesse trabalho *Astyanax* aff. *scabripinnis*.

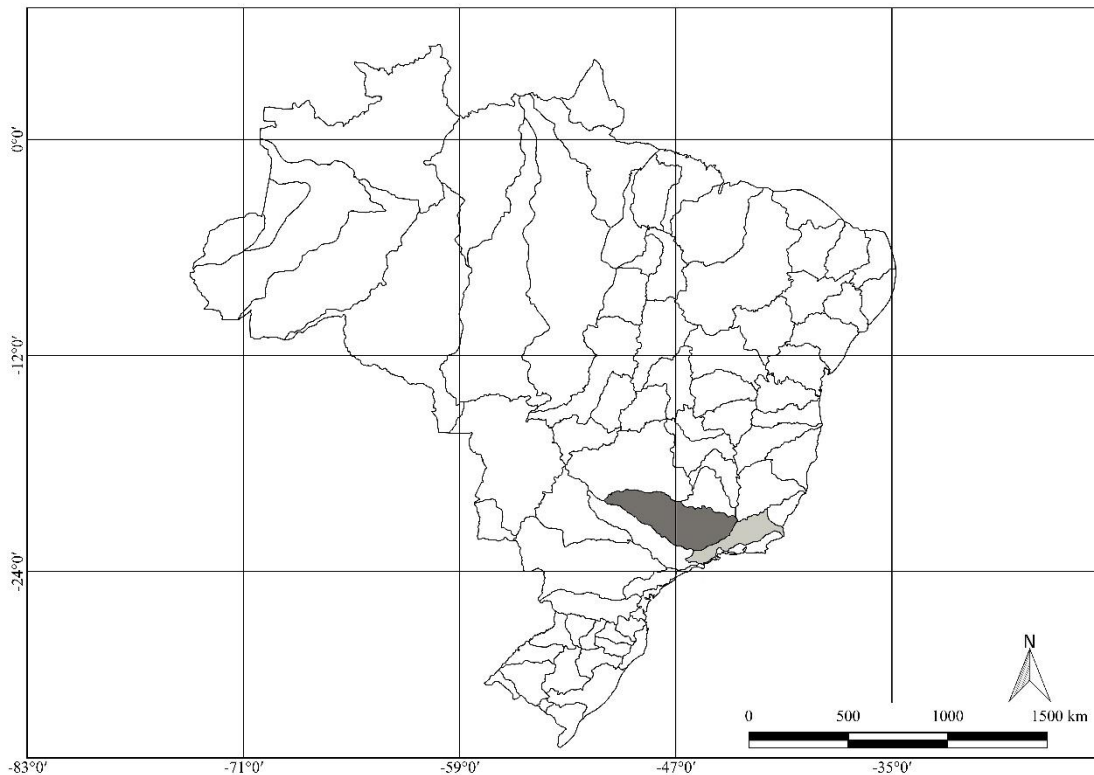


Figura 3 - Representação das bacias hidrográficas brasileiras ottocodificadas, destacando a localização e a separação entre as bacias hidrográficas do Rio Grande (cinza escuro) e do Rio Paraíba do Sul (cinza claro). Fonte: ANA - Agência Nacional de Águas. Disponível em: <http://metadados.ana.gov.br/geonetwork/srv/pt/main.home?uid=fe192ba0-45a9-4215-90a5-3fba6abea174>. Acesso em 23/01/2018.

As coletas foram realizadas pelas equipes do Laboratório de Genética Evolutiva – LabGEv - da Universidade Estadual de Ponta Grossa e do Laboratório de Citogenética de Peixes - LCP - da Universidade Federal de São Carlos entre setembro de 2010 e maio de 2014. Para o estudo genético-populacional com marcadores de microssatélites, foram utilizados 178 exemplares de *Astyanax* aff. *scabripinnis* de seis diferentes populações. Todas as populações foram coletadas em pequenos corpos d’água ou em tanques artificiais, abastecidos por corpos d’água (figura 4). Três populações pertencem à bacia do Rio Paraíba do Sul (Córrego Lavrinhas, Ribeirão Grande e Ribeirão Pequeno) e as outras três pertencem à bacia do Rio Sapucaí, tributário do Rio Grande, que por sua vez é tributário do baixo Rio Paraná (Córrego das Pedras, Lago Capivari-Rio Capivari e Ribeirão Perdizes). As localidades, os códigos atribuídos às populações, os tamanhos das amostras, os municípios e as coordenadas geográficas dos pontos de coleta podem ser vistos na tabela 1. A mesma tabela também traz para cinco das populações

o número do *voucher* gerado pelo depósito de alguns dos exemplares em museus de ictiologia/zoologia. O pequeno número de indivíduos coletados na população Ribeirão Pequeno impossibilitou o seu depósito. A figura 4 traz as disposições dos pontos de coleta em relação as bacias de drenagem dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul, destacando a separação entre elas. Traz também a disposição dos pontos de coleta nos municípios de Campos do Jordão, Guaratinguetá e Pindamonhangaba/SP.

Para as coletas foram utilizados peneirões com tela de 0,5 mm entrenós adjacentes, tarrafas com entrenós adjacentes de 1 centímetro ou armadilhas tipo covó. Os exemplares coletados foram acondicionados em sacos plásticos com oxigênio e transportados vivos ao Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As coletas foram realizadas em conformidade com a legislação vigente, com autorização de coleta permanente conferida pelo Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis-ICMBio (MMA/SISBio, número 15115-1; Anexo A) ao Professor Doutor Roberto Ferreira Artoni.

Tabela 1 – Localidades, códigos das populações, municípios, coordenadas geográficas dos pontos de coleta e números dos vouchers (número de tombo) de museus de ictiologia/zoologia.

Localidade/Código da população	Município	N	Coordenadas geográficas	Elevação	Número voucher
Córrego das Pedras / CP	Campos do Jordão/SP	36	22°43'33.2"S 45°33'7.40"W	1619 m	MZUEL 5655
Córrego Perdizes / PE	Campos do Jordão/SP	30	22°44'35.3"S 45°34'11.6"W	1638 m	NUP 17484
Lago Capivari / LC	Campos do Jordão/SP	30	22°43'02.8"S 45°33'51.9"W	1558 m	NUP 17486
Ribeirão Grande / RG	Pindamonhangaba/SP	21	22°46'57.38"S 45°26'33.80"W	921 m	MZUEL 5656
Córrego Lavrinhas / LV	Guaratinguetá/SP	35	22°40'46.8"S 45°23'33.2"W	1863 m	NUP 17482
Ribeirão Pequeno / RP	Pindamonhangaba /SP	26	22°52'13.75"S 45°35'43.51"W	606 m	

MZUEL: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina; NUP: Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) da Universidade Estadual de Maringá.

No laboratório, os exemplares coletados foram eutanasiados em solução de benzocaína 3%, até a total paralisação dos movimentos operculares. O DNA total foi extraído a partir de, por volta, de 0,5 cm³ de tecido muscular, retirado do lado esquerdo dos exemplares, entre a linha lateral e a nadadeira anal. Nesta etapa, certo cuidado foi tomado para que cada exemplar

fosse o menos danificado possível, de forma que, se necessário, uma posterior confirmação da espécie por especialista seria possível. Após a extração do tecido muscular, todos os exemplares

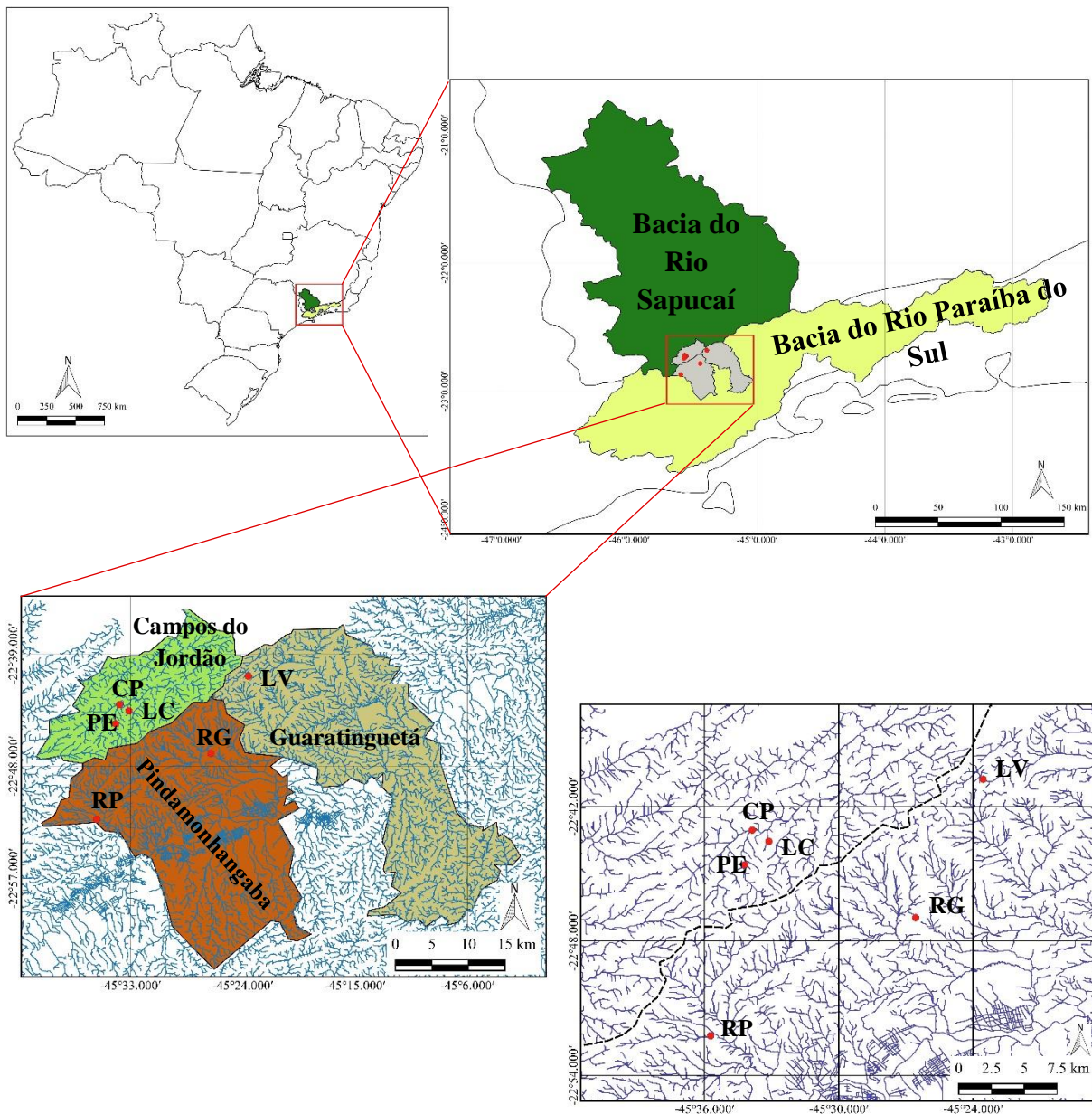


Figura 4 – Localização dos pontos de coleta em relação às bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul e em relação aos municípios de Guaratinguetá, Pindamonhangaba e Campos do Jordão. CP - Córrego das Pedras; PE - Córrego Perdizes; LC - Lago Capivari; RG - Ribeirão Grande; LV - Córrego Lavrinhas; RP - Ribeirão Pequeno.

foram identificados individualmente, recebendo um código com a sigla da população e um número (por exemplo, LC01: exemplar coletado no Lago Capivari, cuja numeração atribuída é 01). As técnicas utilizadas para eutanásia e extração de tecidos foram previamente aprovadas por Subcomissão de Ética em Animais da UEPG (Anexo B).

As distâncias entre os pontos de coleta foram medidas utilizando o programa QGIS 2.18.15 (disponível em: https://www.qgis.org/pt_BR/site/forusers/download.html, acesso em 24/09/2018) com SRC WGS 84, seguindo o corpo d'água e percorrendo o menor caminho entre os pontos de coleta. Para os locais de coleta entre diferentes bacias os pontos mais próximos entre as duas bacias foram ligados, seguindo o caminho pelo corpo d'água, até o ponto mais próximo entre as duas bacias. Portanto, não foi utilizada simplesmente a distância em linha reta entre os pontos. As distâncias geográficas entre os pontos de coleta foram colocadas em uma matriz pareada (figura 5) e posteriormente essa matriz foi correlacionada com dados genéticos.

	CP	PE	LC	RG	LV	RP
CP	0					
PE	3.505	0				
LC	2.597	6.102	0			
RG	28.080	30.079	27.697	0		
LV	27.827	30.424	27.444	101.530	0	
RP	25.276	21.771	27.873	66.322	117.219	0

Figura 5 – Matriz pareada de distância geográfica (em metros) entre seis pontos de coleta de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

4.3 Extrações de DNA

As extrações de DNA total se deram pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio; BOYCE, ZWICK e AQUADROT, 1989), com algumas modificações. Inicialmente, uma mistura foi feita contendo 360 µl de tampão do CTAB, 13 µl de proteinase K (10 mg/mL), 10 µl de Ribonuclease (10 mg/mL), 5 µl de Beta-Mercaptoetanol e 240 µl de CTAB a 5%. Essa mistura foi colocada em microtubos de 1,5 ml junto com o tecido muscular de cada exemplar. Posteriormente, os microtubos foram colocados em banho-Maria a 60°C por 10 horas, ou até que o tecido estivesse totalmente digerido. Decorrido esse tempo, a cada microtubo foi adicionado 600 µl de clorofórmio e estes foram agitados suavemente por cinco minutos, depois centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C e 8.000 RPM por cinco minutos. Ao final dessa etapa, três fases apareceram em cada microtubo, estando o DNA na fase superior. Esta foi retirada cuidadosamente com uma micropipeta e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 600 µl de álcool etílico absoluto e deixado em repouso por duas horas, no mínimo. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 RPM, descartados os sobrenadantes e os pellets lavados com 500 µl de álcool etílico 70%,

centrifugados novamente a 14.000 RPM por mais dois minutos e os sobrenadantes novamente descartados. Por último, os tubos foram colocados em uma estufa a 40°C para a total evaporação do álcool e os pellets foram ressuspensos em 150 µl de tampão Tris-EDTA (TE). Todos os produtos de extração foram quantificados no espectrofotômetro *NanoVue™* (*GE Life Sciences*), determinando-se assim o teor de DNA na amostra em nanogramas por microlitro (ng/µl). Após a quantificação, novos tubos com DNA estoque a serem usados nas reações de amplificação, foram feitos. Nestes, a quantidade de DNA foi padronizada em 50 ng/µl.

4.4 Seleção de Marcadores e Amplificação dos *Loci* de Microssatélites

Para as análises genético-populacionais, inicialmente optou-se por elencar marcadores que pudessem ser responsivos, fazendo assim, com que os objetivos pudessem ser atingidos. Deste modo, optou-se por utilizar marcadores baseados em microssatélites, que por diversos motivos apresentaram vantagens.

Sendo assim, foram feitos testes de transferibilidade para todos os *primers* de loci de microssatélites descritos por Zaganini et al. (2012) para *Astyanax altiparanae*, os quais, segundo os autores, também apresentaram boa transferibilidade para outras espécies, tanto do gênero *Astyanax* quanto para outras espécies não congêneres. Inicialmente, as PCRs foram conduzidas nas mesmas condições descritas por Zaganini et al. (2012), modificando-se apenas a temperatura de anelamento, o chamado teste de gradiente. Para isso, utilizou-se como média a temperatura de anelamento descrita como ideal pelos autores, acrescentando quatro graus centígrados acima e abaixo (tabela 2). Os produtos de PCRs foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em fotodocumentador com luminescência ultravioleta. Os marcadores elencados foram aqueles que apresentaram, nos géis um menor número de bandas inespecíficas e bandas específicas bem definidas.

Após os testes de amplificação, seis deles foram utilizados para os estudos populacionais (tabela 2), todos polimórficos. As amplificações foram feitas utilizando-se o *Kit GoTaq™ Green Master Mix* da Promega, com *primers Forward* acrescidos da cauda M13 e com o *primer* universal M13 marcado com três fluorocromos diferentes (FAM, HEX e NED), conforme descrito por Schuelke (2000). As PCRs foram realizadas num volume final de 10 µl compostos por 4,5 µl do *Kit GoTaq™ Green Master Mix*, 0,32 µl dos *primers reverse* e M13 (concentração final na reação de 0,32 pmol/µl), 0,08 µl do *primer forward* (concentração final

na reação de 0,08 pmol/μl) acrescido da cauda M13, 2 μl da amostra de DNA (20 ng na reação final) e 2,78 μl de água ultrapura. Os ciclos de ampliações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação de cinco minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para a desnaturação, 30 segundos de anelamento, onde a temperatura dependia dos *primers*, e 30 segundos de extensão a 72°C. Terminados os 35 ciclos, sucediam-se mais oito para a marcação dos fragmentos, compostos por uma etapa inicial de desnaturação de 95°C, anelamento a 53°C e extensão a 72°C, todos por 30 segundos. Finalmente, perfizera-se uma etapa de extensão de 72°C por cinco minutos.

Tabela 2 – Temperaturas de anelamento descritas por Zaganini et al. (2012), temperaturas de anelamento usadas no teste de gradiente e usadas em todas as ampliações.

<i>Primers</i>	T°C anelamento autor*	T°C anelamento gradiente	T°C anelamento usada	<i>Motifs</i> de repetição*	Tamanho dos alelos*
Asty 04	53°C	49 °C - 57 °C	56 °C	(AC) ₁₇	200
Asty 11	50°C	46 °C - 54 °C	-	(AC) ₁₂	151
Asty 12	58°C	54 °C - 62 °C	58 °C	(GT) ₈	163
Asty 13	58°C	54 °C - 62 °C	-	(GT) ₈	160
Asty 15	50°C	46 °C - 54 °C	-	(AC) ₁₇ –(CT) ₆	212
Asty 16	52°C	48 °C - 56 °C	-	(AC) ₁₀	165
Asty 21	57°C	53 °C - 61 °C	54 °C	(CA) ₉	150
Asty 23	52°C	48 °C - 56 °C	54 °C	(CA) ₁₂	160
Asty 24	52°C	48 °C - 56 °C	-	(GT) ₉	139
Asty 26	58°C	54 °C - 62 °C	54 °C	(GT) ₈	190
Asty 27	58°C	54 °C - 62 °C	58 °C	(GT) ₈	150

Fonte: Zaganini et al. (2012)

Para as genotipagens, foram feitas misturas com os produtos de PCR, de forma que cada capilar pudesse receber os três fluorocromos. Nessa etapa, para reduzir a probabilidade de interferência ou de sobreposição de picos, utilizou-se marcadores com tamanhos diferentes. As genotipagens foram feitas em um sequenciador ABI 3500 XL (*Applied Biosystems*), utilizando-se como padrão de tamanho o GeneScan 600 LIZ® (*ThermoFisher Scientific*) e os eletroferogramas foram interpretados com o programa GELQUEST (*Sequentix – Digital DNA Processing – Klein Raden, Germany*).

Vale ressaltar, entretanto, que após a descrição dos *primers*, parte do complexo *Astyanax bimaculatus*, do qual *A. altiparanae* faz parte, foi revisado por Lucena e Soares (2016). Os autores propuseram que *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis* e *A. asuncionensis* são considerados sinônimos juniores de *A. lacustris* Lütken, 1875. Contudo recente estudo com

marcadores cromossômicos, demonstrou diferenças na fórmula cariotípica, nas localizações das regiões organizadoras do nucléolo e nas localizações de genes ribossomais (GAVAZZONI et al., 2018). De forma semelhante, Rossini et al. (2018) encontraram três grupos geneticamente diferenciados, identificados como *A. lacustris*. Assim, optou-se por usar a nomenclatura *A. altiparanae*, neste trabalho.

4.5 Amplificação dos Fragmentos de DNA Mitocondrial

Foram utilizados dois fragmentos de DNA mitocondrial para complementar as análises baseadas em microssatélites. Cinco indivíduos de cada população foram utilizados para as amplificações e os sequenciamentos, sempre utilizando as sequências forward e reverse. O primeiro gene, mitocondrial, foi o Citocromo C Oxidase subunidade I. A partir do DNA total extraído, as amplificações ocorreram utilizando os *primers* FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC - 3') e FishR1 (5' - TAGACTTCTGGG TGGCCAAAGAATCA - 3') (WARD et al., 2005). As reações de amplificação foram feitas em soluções contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de cada *primer* (Forward e Reverse) e 0,2 unidade de Taq DNA Polimerase e 25 ng de DNA de cada indivíduo, complementados com 2,5 μl de tampão da enzima (10X) e água ultrapura para um volume final de 25 μl. Os ciclos de amplificação ocorreram com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para a desnaturação, 30 segundos a 54°C para o anelamento dos *primers* e um minuto a 72°C para a extensão. Após os ciclos, uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

O segundo fragmento utilizado, refere-se às subunidades 6 e 8 do gene ATPase (ATPase 6/8), através dos *primers* L8331 (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC - 3') (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001). As reações de amplificação foram feitas em soluções contendo 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de cada *primer* (Forward e Reverse), 0,2 unidade de Taq DNA Polimerase e 25 ng de DNA de cada indivíduo, complementados com 2,5 μl de tampão da enzima (10X) e água ultrapura para um volume final de 25 μl. Os ciclos de amplificação ocorreram com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C para a desnaturação, 45 segundos a 57°C para o anelamento dos *primers* e um minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão. Após os ciclos, uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

Finalizadas as PCRs, todos os produtos foram aplicados em gel de agarose 1% para a checagem da qualidade das amplificações. Esses produtos foram então purificados com o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)* de acordo com as instruções do fabricante. Após as purificações os fragmentos amplificados foram enviados para o sequenciamento. As sequencias de COI foram enviadas para a empresa ACTGene, ligada a Ludwig Biotecnologia Ltda, localizada em Alvorada-RS. Já as sequencias de ATPase foram enviadas para Macrogen, Seoul-KOR.

4.6 Análises Estatísticas para Microsatélites

Como discutido anteriormente e como amplamente conhecido pela ciência, o gênero *Astyanax* e, de forma mais específica, o complexo *Astyanax scabripinnis*, apresentam diversos problemas e identificação, o que dificulta a determinação de espécies. Para tentar dirimir esses problemas de classificação e identificação, inicialmente o gene Citocromo C Oxidase subunidade I foi utilizado para a verificação da distância genética entre as populações. O COI foi utilizado devido a seu alto poder na resolução de problemas de identificação de espécies animais, tendo sido por isso proposto como o DNA *Barcoding* (HEBERT et al., 2003). Para isso, foram geradas sequências consenso de cada população e testadas as distâncias genéticas entre elas, utilizando o MEGA 7.0: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms* (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2016), com modelo de substituição nucleotíca Kimura 2-Parâmetros.

O programa GELQUEST, assim como outros programas para a interpretação de eletroferogramas, resulta em planilhas onde o tamanho dos alelos não aparece em números inteiros. Isso ocorre pois os programas assumem que a taxa de migração dos fragmentos amplificados e dos padrões de tamanho é a mesma. Contudo esta depende não só do tamanho dos fragmentos, mas dos também *motifs* de repetição e das marcações com fluorescência, por exemplo (MATSCHINER e SALZBURGER, 2009). Neste caso, um simples arredondamento pode mascarar a variabilidade genética e, para evitar isso, o programa TANDEM (MATSCHINER e SALZBURGER, 2009) foi utilizado. Esse software aplica uma minimização de quadrados mínimos para arredondar os tamanhos dos alelos, usando parâmetros de otimização determinados empiricamente, ou seja, ele usa como ponto fixo o menor alelo e substitui os valores da maneira mais consistente um em relação ao outro. Ao final, o programa

fornece uma taxa de erro média para os arredondamentos, que, para todos os loci, foi menor do que 0,6 pb.

Após o término do tratamento estatístico para arredondamento do tamanho dos alelos, as análises populacionais foram conduzidas. Inicialmente, foram investigados problemas de genotipagem, tais como a existência de alelos nulos, *stuttering* e *allelic dropout*s utilizando o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Como foi detectada a presença de alelos nulos em diversos loci (será mostrado mais adiante, nos resultados), os genótipos foram ajustados com o mesmo programa. Desta forma, diversas das análises seguintes foram conduzidas com os genótipos ajustados, de forma que a influência dos alelos nulos fosse minimizada e alguns resultados são mostrados tanto para os genótipos ajustados quanto para os genótipos não ajustados. O programa FREENA foi utilizado para a correção do F_{ST} , através do método ENA (*excluding null alleles*, CHAPUIS e ESTOUP, 2007). Este método corrige o viés positivo induzido pela presença de alelos nulos e corrige os valores de F_{ST} na presença destes. Posteriormente, para investigar a presença de *loci* ligados, o Desequilíbrio de Ligação foi testado em dois programas que mostraram resultados semelhantes: ARLEQUIN 3.5.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) e GENEPOP 1.2-*on line* (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e corrigidos com o Ajuste Sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Ambos os testes foram conduzidos com 10.000 desmemorizações, 1.000 *batches* e 10.000 interações por *batch*.

Para os seis loci utilizados foram calculados o número médio de alelos por *locus* (N_a), o número efetivo de alelos (N_E), o número de alelos privados (N_{AP}), os níveis de heterozigidade observada e esperada (H_O e H_E , respectivamente) e os índices de fixação gênica para cada população utilizando GENALEX 6.501 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). A riqueza alélica (A_R) foi calculada através do HP-Rare (KALINOWSKI, 2005), utilizando o fator de rarefação igual a 26, que é o maior número de alelos encontrado em um único *locus*. Esse programa funciona utilizando o modelo de rarefação desenvolvido por Hurlbert (1971) corrigindo os erros de amostragem, já que as coletas nem sempre resultaram no mesmo número de indivíduos.

A investigação de *loci* fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada com os testes exatos do GENEPOP 1.2-*on line* (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e do ARLEQUIN 3.5.2 (Excoffier and Lischer, 2010), com 10.000 desmemorizações, 1.000 *batches* e 10.000 interações por *batches*, como parâmetros para as cadeias de Markov. Ambos os programas baseiam-se no algoritmo desenvolvido por Guo e Thompson (1992), apropriado para estudo de populações com microssatélites que apresentam vários alelos por *locus*.

As investigações da estruturação populacional foram realizadas inicialmente através da Análise das Coordenadas Principais (PCoA) usando a matriz de F_{ST} pareada, com valores ajustados para a presença de alelos nulos, fornecida pelo FREENA (CHAPUIS e ESTOUP, 2007), no programa GENALEX 6.501 (PEAKALL e SMOUSE, 2012).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no ARLEQUIN 3.5.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010), com 10.000 permutações, supondo-se dois padrões de hierarquização. O primeiro padrão de hierarquização suposto segue a lógica de separação de ambas as populações em duas bacias hidrográficas: populações de corpos d'água que drenam para a bacia do Rio Sapucaí e populações de corpos d'água que drenam para a bacia do Rio Paraíba do Sul. Já no segundo, os dados foram hierarquizados supondo a formação de três grupos. O primeiro formado pelas populações CP, PE, RG e LV, o segundo grupo formado somente pela população LC e o terceiro pela população RP. Essa hipótese de hierarquização foi extraída dos resultados da Análise das Coordenadas Principais (PCoA) e da análise Bayesiana do STRUCTURE.

Os padrões de estruturação populacional foram investigados através do STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000), usando o modelo de ancestralidade misturada com as frequências alélicas correlacionadas entre as populações. O melhor valor de K (número de populações ou clusters) foi determinado testando os valores de K de 1 a 7, com 20 réplicas cada. O período de *burn-in* foi de 10.000 com número simulações de Monte Carlo via cadeias de Markov de 100.000 após o *burn-in*. O valor de K que melhor explica a estruturação das populações, foi determinado de acordo com Evanno, Regnaut e Goudet. (2005), usando a ferramenta *on line* Structure Harvester (EARL e VONHOLDT, 2012 – disponível em: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)

As análises no STRUCTURE foram conduzidas seguindo a metodologia para estudo da hierarquização de Coulon et al. (2008). Por essa abordagem, inicialmente o número de grupos genéticos foi determinado (melhor valor de K). Com esse valor determinado, as populações foram separadas, de acordo com os grupos obtidos e novas corridas foram realizadas, seguindo os mesmos parâmetros, em cada grupo. Esses procedimentos foram repetidos até que, cada corrida, resultasse nos níveis menos inclusivos quanto possível, ou seja, até que as análises não demonstrassem a hierarquização em grupos genéticos, superiores as populações.

Com o objetivo de verificar o isolamento por distância, foi montada uma matriz de distância geográfica entre os pontos de coleta (figura 5) no GENALEX 6.501 (PEAKALL e SMOUSE, 2012) que foi correlacionada com a matriz de distância genética ($F_{ST}/(1-F_{ST})$), através

do teste de Mantel, com 999 permutações (MANTEL, 1967). O teste de Mantel também foi realizado utilizando a matriz de distância geográfica e a matriz de distância genética somente com as populações de uma mesma bacia.

O *software* MIGRATE 3.6.11 (BEERLI, 2012), foi utilizado para identificar os padrões de fluxo gênico (taxa de mutação) e calcular o Tamanho Efetivo Populacional (N_e) para cada uma das populações. Este programa é capaz de estimar ambos os parâmetros através da inferência bayesiana e do princípio da máxima verossimilhança. MIGRATE calcula dois parâmetros populacionais escalados pela taxa de mutação: a taxa de migração, expressa por M e o tamanho efetivo populacional, expresso por N_e . A taxa de migração escalada pela taxa de mutação, depende, então de dois fatores. O primeiro, m , é a taxa de migração, que é a fração de indivíduos de uma população composta por imigrantes ou a probabilidade de um indivíduo escolhido aleatoriamente ser um imigrante e o segundo é, evidentemente, a taxa de mutação (μ). Desta forma, $M_{i \rightarrow j} = m_{i \rightarrow j} / \mu$ representa a taxa de imigrantes, dentro do tamanho efetivo populacional, na população j vindos da população i . Há de se destacar que a m expressa a taxa de migração de uma população para outra na geração anterior a coleta. Já o tamanho efetivo populacional escalado pela taxa de mutação (θ) depende da “herança escalar” x , do tamanho efetivo populacional e da taxa de mutação. Desta forma, $\theta = xN_e\mu$. A “herança escalar” x depende do tipo de marcador a ser usado o que determina sua taxa de transmissão à descendência. Marcadores nucleares diploides possuem $x = 4$, enquanto marcadores haploides, onde o mecanismo de herança pode ser tanto paterno quanto materno $x = 2$. Para DNA mitocondrial, em seres vivos gonocóristicos sem reversão sexual, $x = 1$. Porém, se houver mudança de sexo ao longo da vida e se a proporção sexual for diferente de 1, x também será diferente de 1. O valor da taxa de mutação aqui utilizado foi de $5,56 \times 10^{-4}$ (YUE, DAVID e ORBAN, 2007 e BRADIC et al., 2012).

Para tentar identificar os padrões de fluxo gênico, foi utilizada uma cadeia com 500.000 passos sem réplicas, sendo estes amostrados a cada 100 passos, sendo os primeiros 10.000 passos descartados (*burn-in*), como parâmetros para a inferência Bayesiana. O modelo de evolução usado para os *loci* de microssatélites foi o de mutação de passo únicos (*single-step mutations*) Para essas análises, foram utilizadas três estratégias: (a) investigação do fluxo gênico somente entre as populações da bacia do Sapucaí; (b) investigação do fluxo gênico somente entre as populações da bacia do Paraíba do Sul e (c) investigação do fluxo gênico entre a bacia do Sapucaí e entre a bacia do Paraíba do Sul. Em todas as análises foram usadas as distâncias geográficas entre os pontos de coleta.

Reduções do tamanho efetivo populacional estão intimamente relacionadas a ocorrência de gargalos populacionais, os chamados *bottlenecks* (SPENCER, NEIGEL e LEBERG, 2000). A população que passa um evento de *bottleneck*, tem redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, aumentada a probabilidade de endogamia, o que compromete sua capacidade de adaptação a possíveis mudanças no ambiente e reduz sua viabilidade (ALLEN DORF e LEARY 1986; NEWMAN e PILSON 1997; WESTEMEIER et al. 1998). Para investigar ocorrência desses processos, o software BOTTLENECK 1.2.02 (CORNUET e LUIKART, 1996) foi utilizado. O software calcula a probabilidade da ocorrência de excesso de heteroziguidade, comparando a heteroziguidade esperada e a observada de acordo com Nei (1978). Para o teste, a hipótese nula é um excesso de heteroziguidade não significativo e, conseqüentemente, a hipótese alternativa afirma que o excesso de heteroziguidade é significativo, logo há evidência de um recente *bottleneck* (PIRY, LUIKART E CORNUET, 1999). Desta forma, populações que passaram ou passam por um *bottleneck* apresentam um excesso de heteroziguidade (sensu NEI, 1987 apud CORNUET e LUIKART, 1996). Como parâmetros o modelo de duas fases (*two-phased model* - TPM) foi utilizado, assumindo 95% de mutações de passos únicos (*single-step mutations*) e 5% de mutações de múltiplos passos (*multiple-step mutations*), com variância entre os múltiplos passos de 12 (PIRY, LUIKART e CORNUET, 1999) e 1000 replicações. Deve-se destacar que, o excesso de heteroziguidade (sensu Nei, 1978) a que se refere o software BOTTLENECK é diferente do excesso de heterozigotos, inferido pela comparação entre a heteroziguidade observada e esperada no EHW.

4.7 Análises Estatísticas para os Fragmentos de DNA Mitocondrial

Todas as sequências obtidas dos genes ATPase e COI para cada indivíduo, foram comparadas com sequências depositadas no GeneBank, para a confirmação. Posteriormente foram checadas quanto à presença de gaps ou bases desalinhadas no programa MEGA 7.0 (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2015). No mesmo programa, as sequências *forward* e *reverse* de cada indivíduo foram corrigidas manualmente, ou seja, cada mutação ou ausência de determinação das bases foram checadas individualmente e as sequências consenso para cada indivíduo foram geradas. Com as sequências consenso de cada indivíduo, todas as sequências de todos os indivíduos foram alinhadas utilizando-se o MUSCLE (EDGAR, 2004 -

implementado no próprio MEGA 7) e os pontos de mutação e/ou pontos de ausência de determinação de bases foram checados novamente, um a um.

Após alinhadas e editadas, as sequências dos genes COI e ATPase foram usadas para a construção de árvores. Para enraizamento das árvores, foram utilizadas sequências extraídas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de *Astyanax mexicanus* (ATPase: código de acesso AF287358, acesso em 12/07/2018; COI: código de acesso EU751631, acesso em 28/06/2018) e *Astyanax paranae* (ATPase: código de acesso KX609386, acesso em 07/08/2018; COI: código de acesso KY268246, acesso em 07/08/2018).

Utilizando-se também o MEGA, foi determinado, para cada fragmento, o melhor modelo de substituição nucleotídica. Para isso, o método estatístico usado foi o de máxima verossimilhança e com deleções completas, usando filtro de troca *branch* moderado. Feito isso, as árvores filogenéticas de *Neiborg-Joining*, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia foram geradas no próprio MEGA. Para a geração das árvores de Máxima Verossimilhança e *Neiborg-Joining* foi utilizado o método de *bootstrap*, com 1050 interações. Para a árvore utilizando a máxima parcimônia foram utilizadas 10 árvores iniciais, restando um número máximo de 100 árvores. Para o fragmento ATPase, foi utilizado o modelo de substituição Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985), com taxa de distribuição uniforme entre os sítios, já para o COI foi utilizado como modelo Kimura dois parâmetros (KIMURA, 1980), também com distribuição uniforme.

Os parâmetros de diversidade genética para os fragmentos de COI e ATPase, a saber diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), e análises de estruturação populacional por AMOVA (Análise de Variância Molecular), foram conduzidos no software ARLEQUIN 3.5.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Para a AMOVA, assim como nos microssatélites, dois modelos de estruturação foram testados: a separação das populações em bacias e formação dos grupos genéticos ou clusters. O primeiro grupo formado pelas populações PE+CP+RG+LV, o segundo composto pela população RP e o terceiro pela população LC. Também no ARLEQUIN foram feitos os testes de neutralidade seletiva D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU e LI, 1993) tanto para o COI quanto para o ATPase.

O software MR.BAYES 3.2 (RONQUIST et al., 2012) foi utilizado para gerar as árvores concatenadas entre ambos os fragmentos de DNA mitocondrial. Para isso, foram usadas 1.000.000 de gerações em duas corridas, com amostragem a cada 1.000 gerações e período de *burnin* de 100.000. Como modelo de substituição nucleotídica dos fragmentos concatenados,

foi utilizado o Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985) para o ATPase e Kimura 2 Parâmetros para o COI, com taxa de distribuição fixa entre os sítios.

As análises de tempo de divergência entre os clados foram feitas no pacote de *softwares* BEAST 2 (BOUCKAERT et al., 2014). O pacote funciona através de análises bayesianas, utilizando Cadeias de Markov Monte Carlo, para a datação de eventos de cladogênese com modelos de relógios moleculares relaxados ou estritos (DRUMMOND e RAMBAUT, 2009). Para ambos os fragmentos, foi utilizado um relógio molecular estrito com taxa de mutação de 1,0 % por sítio por milhão de anos para o fragmento COI (AVISE et al., 1998; BERMINGHAM et al., 1998; ORNELAS-GARCIA et al., 2008; THOMAZ, 2010) e 1,3 % por sítio por milhão de anos para o ATPase (ORNELAS-GARCIA et al., 2008; MARRETA, 2010). Assim, como nas demais análises, os melhores modelos de substituição nucleotídica indicados pelo software MEGA 7.0, foram K2P para o COI e HKY para o ATPase. Finalmente, como parâmetros para a construção das árvores, foram utilizadas árvores de coalescência, consideradas as mais apropriadas quando se tem populações da mesma espécie (KINGMAN, 1982; GRIFFITHS e TAVARE 1994). Para as corridas, foram usadas 200.000.000 de cadeias, com amostragem a cada 1.000 cadeias, com um período de *burnin* de 10% do total de cadeias (antes da amostragem).

Após as corridas, os resultados foram analisados no software TRACER 1.7.1 (RAMBOUT et al., 2018). Este programa é usado para a análise da convergência dos dados e exibe os intervalos de confiança de 95 % e os tamanhos efetivos das amostras (ESS - *Effective Sample Sizes*), para todos os parâmetros.

Os arquivos das árvores construídas com os fragmentos de ATPase e COI, gerados durante a corrida, foram combinados com o programa LOGCOMBINER 2.5.0 (BOUCKAERT et al., 2014) e o software TREEANOTATOR 2.5.0 (BOUCKAERT et al., 2014) foi utilizado para sumarizar as árvores geradas pelo BEAST. Como parâmetros foi utilizado um período de *burnin* de 20.000 árvores e intervalo de confiança de 95 %. Por último, a árvore sumarizada foi visualizada e editada no programa FIGTREE 1.4.3 (disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 17/09/2018).

5 RESULTADOS

O teste de distância genética com DNA *Barcoding* revelou que a maior distância entre duas populações foi de 0,6 %, sendo de 0 entre outras (figura 6). Esses dados mostram que, pela metodologia onde utiliza-se o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I, essas populações podem ser consideradas como sendo da mesma espécie.

	RP	RG	PE	LV	LC	CP
RP	-					
RG	0,006	-				
PE	0,006	0,000	-			
LV	0,006	0,000	0,000	-		
LC	0,000	0,006	0,006	0,006	-	
CP	0,006	0,000	0,000	0,000	0,006	-

Figura 6 – Distâncias genéticas de DNA *Barcoding* entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

5.1 Análises com Microsatélites

O teste de transferabilidade (amplificação cruzada) dos *primers* descritos para *Astyanax altiparanae* (ZAGANINI et al., 2012) para *Astyanax* aff. *scabripinnis* resultou em ampliações positivas para todos os *loci*. No entanto, apenas seis foram usados para o estudo genético populacional, pois eram polimórficos e para, a maioria dos *loci*, resultaram em géis de fácil análise, ou seja, poucas bandas inespecíficas e bandas específicas bem definidas. Embora a genotipagem de todos os indivíduos tenha sido realizada posteriormente em sequenciador automático, a opção de não usar *loci* que não apresentaram bandas inespecíficas, se deu para evitar quaisquer erros de genotipagens. Todas as análises de diversidade genética baseadas nos marcadores de microsatélites foram então conduzidas com esses seis *loci*.

A análise com o MICRO-CHECKER relevou presença de *stutter* somente no *locus* 12 da população do Córrego Lavrinhas. *Allelic dropouts* não foram visualizados. A tabela 3 mostra a relação entre as seis populações e a presença de alelos nulos em todos os *loci*. Como demonstrada anteriormente, na metodologia, os alelos nulos foram retirados da análise e substituídos por *missing data*. A nova matriz gerada com a retirada dos alelos nulos foi utilizada

para rodar as análises seguintes. Os índices de diversidade genética intra e interpopulacional, padrões de estruturação das populações, tais como o F_{ST} , Amova, PCoA, também foram conduzidos com a matriz de genótipos original (ainda com os alelos nulos), os resultados foram confrontados e notou-se que são semelhantes. Porém, a nova matriz sem os alelos nulos, diminuiu o viés causado por estes sobre os genótipos homozigotos, ajustando os valores de fixação gênica e os testes para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As tabelas 4 e 5 mostram os índices de diversidade genética antes e depois o ajuste do programa MICRO-CHECKER, respectivamente.

A análise de Desequilíbrio de Ligação, após o Ajuste Sequencial de Bonferroni (RICE, 1989), não resultou em valores significativos entre ao menos dois dos *loci* em todas as populações. Portanto, nenhum *locus* foi retirado da análise por este motivo.

Tabela 3 – Relação da presença de alelos nulos em seis *loci* de microssatélites em seis populações e para *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

	CP	PE	LC	RGI	LV	RP
Asty21	sim	sim	não	não	sim	sim
Asty23	não	não	não	não	sim	não
Asty26	sim	não	não	não	não	não
Asty27	sim	sim	não	sim	sim	sim
Asty12	sim	sim	sim	não	sim	sim
Asty04	sim	sim	não	sim	sim	não

Todos os *loci* utilizados demonstraram-se polimórficos (tabela 4 e 5), com exceção do Asty27 na população Lago Capivari. Após os ajustes dos genótipos, a média do número de alelos, para todos os *loci* em todas as populações, variou de 4,833 a 9,833, a média do número de alelos efetivos variou de 3,443 a 6,447 e a média da riqueza alélica de 4,591 a 7,785. As médias das heterozigosidades observadas e esperadas, em todas as populações, variaram de 0,563 a 0,698 e 0,626 a 0,825, respectivamente. A população do Córrego da Pedras (CP) foi a que apresentou os maiores valores dos parâmetros de diversidade alélica (número de alelos, número efetivo de alelos e riqueza alélica), e a menor diversidade alélica foi apresentada pela população PE.

A maior heterozigosidade foi observada na população RP, enquanto a menor na população LV, já o maior déficit de heterozigotos foi da população RG, com e sem o ajuste dos genótipos. Os índices de fixação gênica (F_{IS}) e a comparação numérica entre as heterozigosidades esperadas e observadas, sugerem não haver déficit de heterozigotos somente em duas das populações (LC e RP). A observação dos índices de fixação gênica após os ajustes

Tabela 4 – Parâmetros de diversidade genética de seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* das bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul, utilizando-se os genótipos sem o ajuste do programa MICRO-CHECKER

Pop	Locus	N	N _A	N _E	A _R	N _{AP}	H _O	H _E	F _{IS}		
Bacia do Rio Sapucaí-Grande-Paraná	CP	Asty21	36	12	6,353	9,875	6	0,611	0,843	0,275	*
		Asty23	33	11	4,829	9,465	2	0,727	0,793	0,083	
		Asty26	34	5	4,114	4,588	-	0,588	0,757	0,223	*
		Asty27	33	7	4,304	6,539	2	0,273	0,768	0,645	*
		Asty12	30	7	4,972	6,654	2	0,367	0,799	0,541	*
		Asty04	32	17	7,642	14,102	13	0,313	0,869	0,640	*
	M/Σ		9,833	5,369	8,537	25	0,480	0,805	0,401		
	PE	Asty21	30	8	4,800	7,675	1	0,533	0,792	0,326	*
		Asty23	30	4	2,975	3,893	-	0,767	0,664	-0,155	
		Asty26	30	4	2,507	3,667	-	0,467	0,601	0,224	
		Asty27	30	4	3,077	3,667	-	0,200	0,675	0,704	*
		Asty12	30	5	3,571	4,980	-	0,533	0,720	0,259	
Asty04		30	5	3,529	4,997	-	0,267	0,717	0,628	*	
M/Σ		5,0	3,410	4,813	1	0,461	0,695	0,331			
LC	Asty21	29	7	2,900	6,286	-	0,724	0,655	-0,105		
	Asty23	30	7	3,327	6,193	-	0,700	0,699	-0,001		
	Asty26	30	5	3,396	4,657	5	0,800	0,706	-0,134		
	Asty27	30	1	1,000	1,000	-	0,000	0,000	-		
	Asty12	29	7	5,461	6,689	6	0,621	0,817	0,240		
	Asty04	29	12	7,188	10,913	10	0,862	0,861	-0,001		
M/Σ		6,5	3,879	5,956	21	0,618	0,623	-0,0002			
Bacia do Rio Paraíba do Sul	RGI	Asty21	21	6	4,594	5,952	-	0,810	0,782	-0,035	
		Asty23	21	5	3,279	4,905	-	0,714	0,695	-0,028	
		Asty26	21	4	2,602	4,000	-	0,524	0,616	0,149	
		Asty27	21	4	2,527	3,999	1	0,048	0,604	0,921	*
		Asty12	20	6	4,167	6,000	-	0,550	0,760	0,276	*
		Asty04	21	5	2,960	5,000	-	0,333	0,662	0,497	*
	M/Σ		5,0	3,355	4,976	1	0,496	0,687	0,297		
	LV	Asty21	31	9	5,251	8,472	-	0,581	0,810	0,283	*
		Asty23	31	9	4,124	8,318	-	0,452	0,758	0,404	*
		Asty26	35	3	1,514	2,995	-	0,286	0,340	0,159	
		Asty27	34	4	2,521	3,833	-	0,147	0,603	0,756	*
		Asty12	26	5	3,159	4,948	-	0,308	0,683	0,550	*
Asty04		34	5	2,426	4,563	-	0,353	0,588	0,400	*	
M/Σ		5,833	3,166	5,521	-	0,354	0,630	0,425			
RP	Asty21	24	5	3,105	4,972	-	0,500	0,678	0,262	*	
	Asty23	25	9	3,858	8,188	1	0,840	0,741	-0,134		
	Asty26	25	6	2,358	5,757	3	0,520	0,576	0,097		
	Asty27	25	5	3,264	4,763	-	0,360	0,694	0,481	*	
	Asty12	24	9	4,283	8,472	3	0,500	0,766	0,348	*	
	Asty04	26	3	2,058	2,769	1	0,846	0,514	-0,646	*	
M/Σ		6,167	3,154	5,820	8	0,594	0,661	0,068			

N: tamanho da amostra de cada população, N_A: número de alelos diferentes; N_E: número efetivo de alelos; N_{AP}: número de alelos privados; A_R: riqueza alélica; H_O: heterozigosidade observada; H_E: heterozigosidade esperada; F_{IS}: índice de fixação gênica; * *loci* com desvios significativos do esperado no Equilíbrio de Hardy-Weinberg após o ajuste sequencial de Bonferroni, M/Σ: média (para N, N_A, N_E, A_R, H_O, H_E e F_{IS}) ou soma (para N_{AP}) dos parâmetros de diversidade.

Tabela 5 – Parâmetros de diversidade genética de seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* das bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul, utilizando-se os genótipos com o ajuste do programa MICRO-CHECKER

Pop	Locus	N	N _A	N _E	A _R	N _{AP}	H _O	H _E	F _{IS}	
Bacia do Rio Sapucaí-Grande-Paraná	CP	Asty21	30	12	6,977	8,737	6	0,733	0,857	0,144 *
		Asty23	33	11	4,829	8,103	2	0,727	0,793	0,083
		Asty26	26	5	4,147	4,433	-	0,769	0,759	-0,014
		Asty27	15	7	5,488	6,399	2	0,600	0,818	0,266 *
		Asty12	16	7	5,12	6,449	2	0,688	0,805	0,146
		Asty04	20	17	12,121	12,586	13	0,5	0,918	0,455 *
	M/ $\bar{\chi}$		9,833	6,447	7,785	25	0,670	0,825	0,180	
	PE	Asty21	23	7	4,921	6,941	-	0,696	0,797	0,127
		Asty23	30	4	2,975	3,683	-	0,767	0,664	-0,155
		Asty26	30	4	2,507	3,433	-	0,467	0,601	0,224
		Asty27	11	4	3,227	3,634	-	0,545	0,690	0,210 *
		Asty12	23	5	3,752	4,880	-	0,696	0,733	0,052
		Asty04	13	5	3,756	4,977	-	0,615	0,734	0,161
	M/ $\bar{\chi}$		4,833	3,523	4,591	-	0,631	0,703	0,103	
	LC	Asty21	29	7	2,9	5,551	-	0,724	0,655	-0,105
		Asty23	30	7	3,327	5,371	-	0,7	0,699	-0,001
		Asty26	30	5	3,396	4,338	5	0,8	0,706	-0,134
		Asty27	30	1	1	1	-	0	0	-
Asty12		24	7	5,938	6,457	6	0,75	0,832	0,098	
Asty04		29	12	7,188	9,546	10	0,862	0,861	-0,001	
M/ $\bar{\chi}$		6,5	3,958	5,378	21	0,639	0,626	-0,029		
Bacia do Rio Paraíba do Sul	RG	Asty21	21	6	4,594	5,598	-	0,81	0,782	-0,035
		Asty23	21	5	3,279	4,238	-	0,714	0,695	-0,028
		Asty26	21	4	2,602	3,935	-	0,524	0,616	0,149
		Asty27	5	4	3,333	4,000	1	0,2	0,7	0,714
		Asty12	17	6	4,587	5,830	-	0,647	0,782	0,173
		Asty04	13	5	3,756	4,980	-	0,538	0,734	0,266
	M/ $\bar{\chi}$		5	3,692	4,763	1	0,572	0,718	0,207	
	LV	Asty21	26	9	6,259	7,889	-	0,692	0,84	0,176
		Asty23	22	9	4,99	7,69	-	0,636	0,8	0,204
		Asty26	35	3	1,514	2,927	-	0,286	0,34	0,159
		Asty27	8	4	3,282	3,893	-	0,625	0,695	0,101
		Asty12	13	5	3,314	5,456	-	0,615	0,698	0,119
Asty04		23	5	2,612	4,366	-	0,522	0,617	0,155	
M/ $\bar{\chi}$		5,833	3,662	5,370	-	0,563	0,665	0,152		
RP	Asty21	19	5	3,455	4,794	-	0,632	0,711	0,111	
	Asty23	25	9	3,858	6,872	1	0,84	0,741	-0,134	
	Asty26	25	6	2,358	5,180	3	0,52	0,576	0,097	
	Asty27	14	5	3,469	4,561	-	0,643	0,712	0,097	
	Asty12	17	9	5,402	7,718	3	0,706	0,815	0,134	
	Asty04	26	3	2,058	2,5	1	0,846	0,514	-0,646 *	
M/ $\bar{\chi}$		6,167	3,433	5,271	8	0,698	0,678	-0,057		

N: tamanho da amostra de cada população, N_A: número de alelos diferentes; N_E: número efetivo de alelos; N_{AP}: número de alelos privados; A_R: riqueza alélica; H_O: heterozigiosidade observada; H_E: heterozigiosidade esperada; F_{IS}: índice de fixação gênica; * *loci* com desvios significativos do esperado no Equilíbrio de Hardy-Weinberg após o ajuste sequencial de Bonferroni, M/ $\bar{\chi}$: média (para N, N_A, N_E, A_R, H_O, H_E e F_{IS}) ou soma (para N_{AP}) dos parâmetros de diversidade.

dos genótipos, sugerem que pode estar havendo endogamia na maior parte das populações, com exceção apenas das supracitadas LC e RP.

A média dos valores de heterozigosidade observada entre as populações da bacia do Rio Sapucaí foi de 0,647, enquanto que para a bacia do Rio Paraíba do Sul foi 0,611. A média das riquezas alélicas entre as populações da bacia do Sapucaí foi de 5,9 e para a bacia do Paraíba do Sul foi de 5,1. Porém, tanto as médias das heterozigosidades observadas como das riquezas alélicas não são significativamente diferentes a um nível de significância 0,05 ($\chi^2 = 0,0297$ para H_0 e $\chi^2 = 2,0313$ para a riqueza alélica).

Somente a população LV não possui nenhum alelo privado, ao passo que as populações CP e LC possuem altos números de alelos privados (25 e 21, respectivamente). Esses resultados também podem ser vistos na tabela 5.

Para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), os dois programas, que fazem testes exatos, resultaram em dados idênticos, após o ajuste sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Sem o ajuste dos genótipos, do total de 36 testes (seis *loci* em seis populações), 20 foram detectados como estando fora do EHW, a um nível de significância de 5% (tabela 4). Após os ajustes dos genótipos, apenas cinco testes (cerca de 14%) demonstraram-se fora do EHW (tabela 5). A população CP é a que mais tem *loci* fora do equilíbrio enquanto as populações LV, RG e RP não possuem nenhum.

Em virtude dessa presença de alelos nulos, os valores de F_{ST} pareados foram corrigidos pelo método ENA, pelo programa FREENA (CHAPUIS e ESTOUP, 2007). Após a correção, mostraram que a população do Lago Capivari é a mais diferente geneticamente das outras, seguida da população do Ribeirão Pequeno. O valor de F_{ST} global foi 0,144 ($\pm 0,031$) e os valores de F_{ST} par a par são mostrados na figura 7 e todos são bem suportados estatisticamente ($P < 0,05$).

A diferenciação genética das populações LC e RP em relação às outras populações também foi evidenciada pela Análise das Coordenadas Principais (PCoA). O primeiro eixo da Análise das Coordenadas Principais (PCoA) foi capaz de explicar mais de 52% da variação total, mostrando também que LC e RP são bastante diferentes entre si (figura 8).

	CP	PE	LC	RG	LV	RP
CP	0,000					
PE	0,057	0,000				
LC	0,196	0,241	0,000			
RG	0,063	0,020	0,245	0,000		
LV	0,125	0,087	0,317	0,043	0,000	
RP	0,150	0,123	0,264	0,114	0,159	0,000

Figura 7 – Valores de F_{ST} pareados de seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* das bacias do Rio Sapucaí e Paraíba do Sul. Onde, cinza claro indica valores entre 0 e 0,999, cinza médio indica valores entre 0,1 e 0,199 e cinza escuro indica valores maiores que 0,2. Para todos os valores $P < 0,05$.

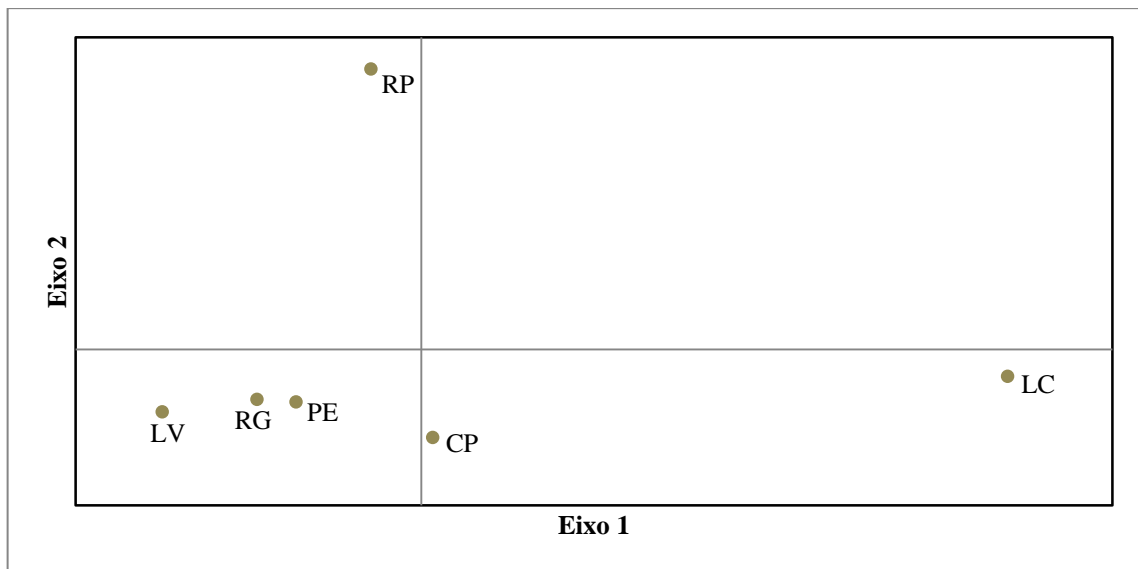


Figura 8 – Análise Coordenadas Principais (PCoA) de seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstra que a hierarquização proposta não corrobora a estruturação populacional em duas bacias de drenagem. Os índices de fixação apontam que há maior variação entre as populações de uma mesma bacia (14,87%) do que entre as duas bacias (3,55%). A maior variação, entretanto, se dá entre todas as seis populações (81,59%), como era de se esperar quando comparada aos dois níveis menos inclusivos (tabela 9).

A hipótese da formação de três grupos genéticos ou clusters, parece explicar melhor a estruturação das populações, pois tem mais sentido quando se analisa a hierarquização da variação. Essa hipótese, inferida a partir dos resultados do STRUCTURE e do PCoA (resultados mostrados adiante), considera a formação de três grupos ou cluster. O primeiro formado pelas populações CP, PE, RG e LV, o segundo somente pela população LC e o terceiro pela população RP. Esta abordagem mostrou que há maior variação entre os grupos (14,74%) do que entre as populações dentro de cada grupo (6,5%). Já, no nível de hierarquização mais inclusivo, que é a redução heterozigosidade média em relação ao total, obteve-se 78,76%, ou seja, a maior parte da variação encontra-se entre as populações. Esses resultados podem ser melhor visualizados na tabela g, que também mostra dos valores das estatísticas-F (F_{ST} , F_{SC} e F_{CT}) e suas probabilidades.

As análises do *software* STRUCTURE foram capazes de identificar os padrões de estruturação das populações. Na primeira rodada, quando as populações foram analisadas sem informações de localidade *a priori*, obteve-se dois grupos genéticos ($K = 2$). O primeiro grupo formado pelas populações CP+PE+RG+LV+RP e o segundo grupo formado pela população LC isoladamente (figura 9a). De acordo com a metodologia proposta por Coulon et al. (2008), uma nova rodada foi realizada, seguindo o padrão de hierarquização e analisando o nível menos inclusivo. Desta forma, a população LC foi retirada e a nova rodada foi realizada com as outras cinco populações.

Essa segunda rodada, revelou três grupos ($K = 3$), sendo o primeiro formado pela população CP isoladamente, o segundo pelas populações PE+RG+LV e o terceiro somente pela população RP (figura 9b). Desta forma, uma nova rodada foi realizada, nesse novo nível hierárquico, com as três populações do segundo grupo. A terceira rodada, separou as populações em 2 grupos ($K = 2$). O primeiro formado pelas populações PE+RG e o segundo pela população LV individualmente (figura 9c). Esse foi o nível menos inclusivo que se conseguiu chegar. Na última rodada somente com as populações PE e RG e supondo $K = 2$, nota-se que não há estruturação evidente entre essas duas populações (figura 9d).

Análise do fluxo gênico, através da taxa de migrantes, entre as populações da bacia do Rio Sapucaí mostrou que há maior fluxo gênico entre as populações CP e PE, sendo o maior sentido de migração de PE para CP, cerca de quatro vezes maior. Mais detalhadamente, a taxa de imigrantes em CP vindos de PE é de quase 40%, enquanto que a taxa de imigrantes no sentido contrário é de cerca de 10% (tabela 6). Entre as populações do Rio Paraíba do Sul, evidências fortes de fluxo gênico foram constatadas entre as populações RG e LV. A taxa de

imigrantes em LV vindos de RG é de cerca de 32%, enquanto que a taxa e imigrantes em LV vindos de RG é de por volta de 20% (tabela 6).

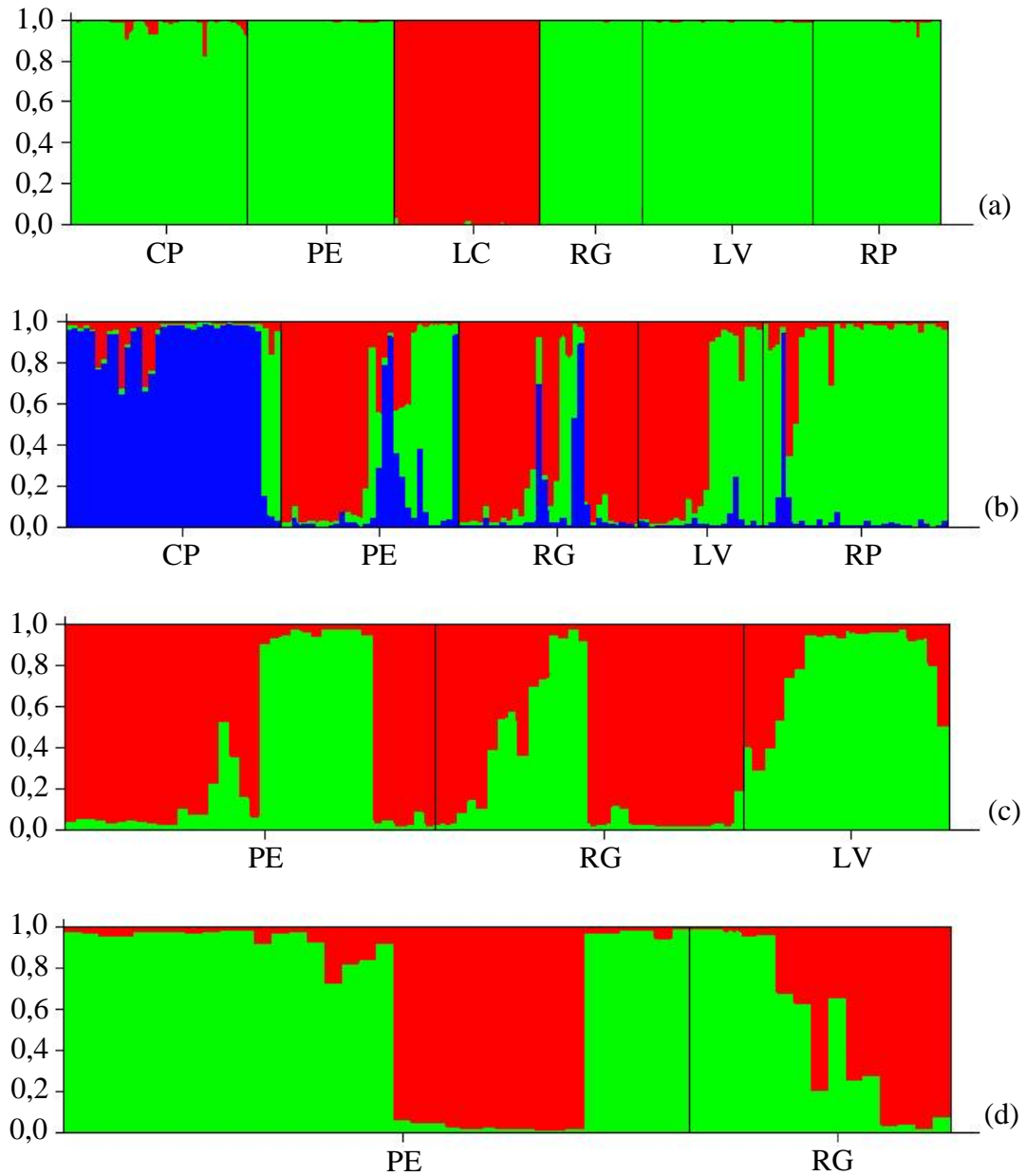


Figura 9 – Estrutura de gráfico de barras (*bar plot*) gerado pelo software STRUCTURE 2.3.4 mostrando a estruturação de seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. (a): resultado da primeira rodada, mostrando a análise das seis populações e que resultou em $K = 2$; (b): resultado da segunda rodada, formada pelo grupo resultante da primeira rodada CP+PE+RGI+LV+RP, resultando em $K = 3$; (c): resultado da terceira rodada, formada pelo grupo resultante da segunda rodada PE+RGI+LV, resultando em $K = 2$; (d): resultado da quarta rodada, análise do grupo formado por PE+RGI, resultante da terceira rodada.

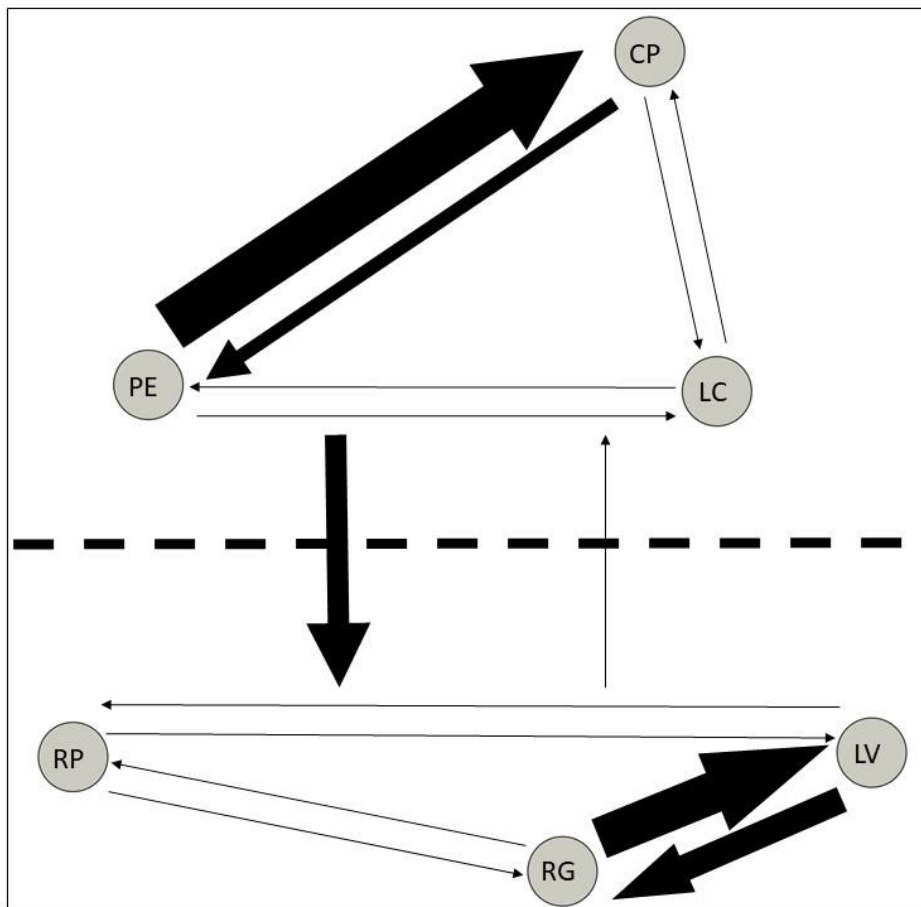


Figura 10 – Taxas de imigração entre as seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da região da Serra da Mantiqueira. Acima, as linhas tracejadas representam a separação entre as bacias dos Rios Sapucaí e Paraíba do Sul. A distância entre os círculos que representam as populações está em escala da distância real entre os pontos de coleta, porém a escala não é proporcional entre as bacias. Abaixo taxa de migração ($m_{i \rightarrow j}$) e a taxa de migração escalada pela taxa de mutação ($M_{i \rightarrow j}$) entre as seis populações.

Analisando as populações do Sapucaí e do Paraíba do Sul como duas grandes populações, nota-se que há evidências de fluxo gênico do Sapucaí para o Paraíba do Sul. A taxa de imigrantes nesse sentido é de cerca de 17%. A figura 10 representa, pela largura das setas a taxa de migração entre as populações de uma mesma bacia e entre ambas as bacias, já a tabela 6, mostra os valores de $M_{i \rightarrow j}$, que é a taxa de migração da população i para a população j , escalada pela taxa de mutação e $m_{i \rightarrow j}$, que é a taxa de migração da população i para a população j .

A tabela 7 mostra os tamanhos efetivos populacionais (N_e), calculados através de inferência bayesiana, realizada pelo programa MIGRATE.

A investigação de *bottlenecks*, assumindo o modelo de mutação de duas fases (*two-phased model* - TPM), segundo o teste de Wincoxon, o mais robusto quando se tem menos de

20 *loci* de microssatélites, revelou um excesso de heterozigidade significativo, sugerindo recente *bottleneck*, somente para as populações PE e RG (nível de significância de $P < 0,05$). Os valores das probabilidades podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 6 – Taxa de migração ($m_{i \rightarrow j}$) e a taxa de migração escalada pela taxa de mutação ($M_{i \rightarrow j}$) entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira

Paraíba do Sul	$M_{i \rightarrow j}$	$m_{i \rightarrow j}$	Sapucaí	$M_{i \rightarrow j}$	$m_{i \rightarrow j}$	Entre bacias	$M_{i \rightarrow j}$	$m_{i \rightarrow j}$
LV→RG	363,935	0,2023	PE→CP	713,571	0,3967	PA→SA	2,402	0,0013
RP→RG	2,402	0,0013	LC→CP	2,402	0,0013	SA→PA	311,909	0,1734
RG→LV	577,278	0,3210	CP→PE	188,573	0,1048			
RP→LV	2,402	0,0013	LC→PE	2,402	0,0013			
RG→RP	2,402	0,0013	CP→LC	2,402	0,0013			
LV→RP	2,402	0,0013	PE→LC	2,402	0,0013			

Tabela 7 – Tamanhos efetivos populacionais (N_e) fornecidos pelo *software* MIGRATE e Probabilidades do teste de Wincoxon (P_{WT}), segundo o modelo de mutação de duas fases (*two-phased model* - TPM), para testar o excesso de heterozigidade, fornecidas pelo *software* BOTTLENECK, para seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da região da Serra da Mantiqueira

Pop	Tamanho efetivo populacional	Excesso de heterozigidade
	N_E	P_{WT} (TPM)
CP	33,7	0,578125
PE	10,7	0,007813
LC	40,4	0,687500
RG	16,9	0,007813
LV	33,5	0,921875
RP	2,9	0,921875

Não foram evidenciados padrões de isolamento por distância quando as distâncias genéticas e geográficas foram correlacionadas pelo Teste de Mantel ($R = -0,229$; $P = 0,386$). De forma semelhante, quando aplicado o teste de Mantel entre as populações de uma mesma bacia, também não foram identificados padrões significativos de isolamento ($R = 0,546$ e $P = 0,314$, para as populações da bacia do Rio Sapucaí e $R = 0,167$ e $P = 0,505$, para as populações do Rio Paraíba do Sul).

5.2 Análises com DNA mitocondrial

A amplificação do gene Citocromo C Oxidase I (COI) resultou em fragmentos de, em média, 668 pb, já as amplificações para o gene ATPase, resultou em fragmentos de 884 pb, em média, após o alinhamento a edição das sequências.

Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica para o gene ATPase variaram de 0 a 0,8333 e de 0 a 0,0073, respectivamente. Já para o COI variaram de 0 a 0,4 e de 0 a 0,37, respectivamente. Não foram obtidos valores significativos para a maioria dos testes de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu). A única exceção foi para a população do Lago Capivari (LC), que apresentou valor negativo e significativo para a ATPase (-1,2219; P = 0,035) no teste D de Tajima. Os resultados dos testes de neutralidade, bem como os valores de diversidade, são apresentados na tabela 8.

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) a partir dos genes mitocondriais, demonstrou que o maior componente da variação encontra-se, entre os grupos (CP+PE+LV+RG, LC e RP), quando testada a hipótese dos grupos. Quando testada a hipótese da hierarquização em duas bacias, nota-se que o maior componente da variação encontra-se entre as populações dentro das bacias (tabela 9).

A análise da topologia das árvores construídas através de *Neiborg-Joining*, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia para o COI, mostrou uma separação nítida, e bem suportada, entre as populações de *Astyanax scabripinnis*, *A. paranae* e *A. mexicanus*, mostrando que essa última espécie é significativamente mais divergente das outras duas. Além disso, as árvores mostraram, a exemplo dos dados de microssatélites, que as populações LC e RP são significativamente diferentes das outras populações (figuras 11, 13 e 15).

As árvores de ATPase, mostraram a mesma diferenciação genética entre as populações LC e RP e as outras populações, porém não foram capazes de separar *A. paranae* das populações CP, RG, PE e LV (figuras 12, 14 e 16). De forma semelhante a árvore concatenada, gerada por inferência Bayesiana no *software* MR.BAYES, agrupou as populações CP, PE, RG e LV com *A. paranae* (figura 17).

A análise do tempo de divergência entre as populações, mostrou que *Astyanax* aff. *scabripinnis* e *A. mexicanus* divergiram durante o Plioceno (figura 18, nó 1, cerca de 3,5 milhões de anos atrás). Já a separação entre as populações é bem mais recente. A divergência mais antiga ocorreu entre LC e as demais populações (figura 18, nó 2, cerca de 220 mil anos). Nitidamente, a segunda separação mais antiga se deu entre a população RP e as demais (figura

18, nó 3, cerca 25 mil anos), porém não foi possível detectar diferença no tempo de divergência entre as demais populações.

Tabela 8 – Valores de diversidade genética e de teste de neutralidade seletiva de ATPase e COI para seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira

Pop	ATPase					COI				
	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>D</i>	<i>F_s</i>	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>D</i>	<i>F_s</i>
CP	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0
LC	5	0,4 0,2373	0,0073 0,0048	-1,2219*	5,5302	5	0,4 0,2373	0,0023 0,002	-1,0938	2,2024
PE	5	0,6 0,1753	0,0007 0,0007	1,2247	0,6262	5	0	0	0	0
LV	4	0	0	0	0	3	0	0	0	0
RP	4	0,8333 0,2224	0,0046 0,0035	-0,4464	1,2253	3	0,4 0,2373	0,0037 0,0029	-1,1455	3,0225
RG	5	0,8 0,1640	0,0013 0,0012	0,2431	-0,4754	5	0	0	0	0

N: tamanho da amostra; *h*: diversidade haplotípica acima e abaixo, na mesma célula o desvio padrão; π : diversidade nucleotídica acima e abaixo, na mesma célula o desvio padrão; *D*: valor do teste D de Tajima; *F_s*: valor do teste *F_s* de Fu; * valor significativo ($P < 0,05$).

Tabela 9 – Valores da variação genética de três marcadores (Microsatélites, COI e ATPase) obtidos através da AMOVA sob duas hipóteses de hierarquização dos dados (Bacia do Sapucaí e do Paraíba do Sul e grupos – CP+PE+LV+RG, LC e RP)

	Hierarquização bacias			Hierarquização grupos		
	SSRs	COI	ATPase	SSRs	COI	ATPase
Entre os grupos/bacias	3,55%	-6.40%	-7,12%	14,74%	78,38%	76,69%
Entre as populações dentro dos grupos/bacias	14,87%	66,1%	67,49%	6,50%	-6,77%	-3,42%
Entre as populações	81,59%	40,3%	39,63%	78,76%	28,39%	26,73%
	Hierarquização bacias			Hierarquização grupos		
F_{CT}	0,0355*	-0,064	-0,0712	0,1474	0,7838	0,7669
F_{SC}	0,1541	0,621*	0,6301*	0,0762	-0,3129	-0,1468
F_{ST}	0,1841	0,597*	0,6037*	0,2124	0,7161*	0,7327*

* Valor significativo ($P < 0,05$)

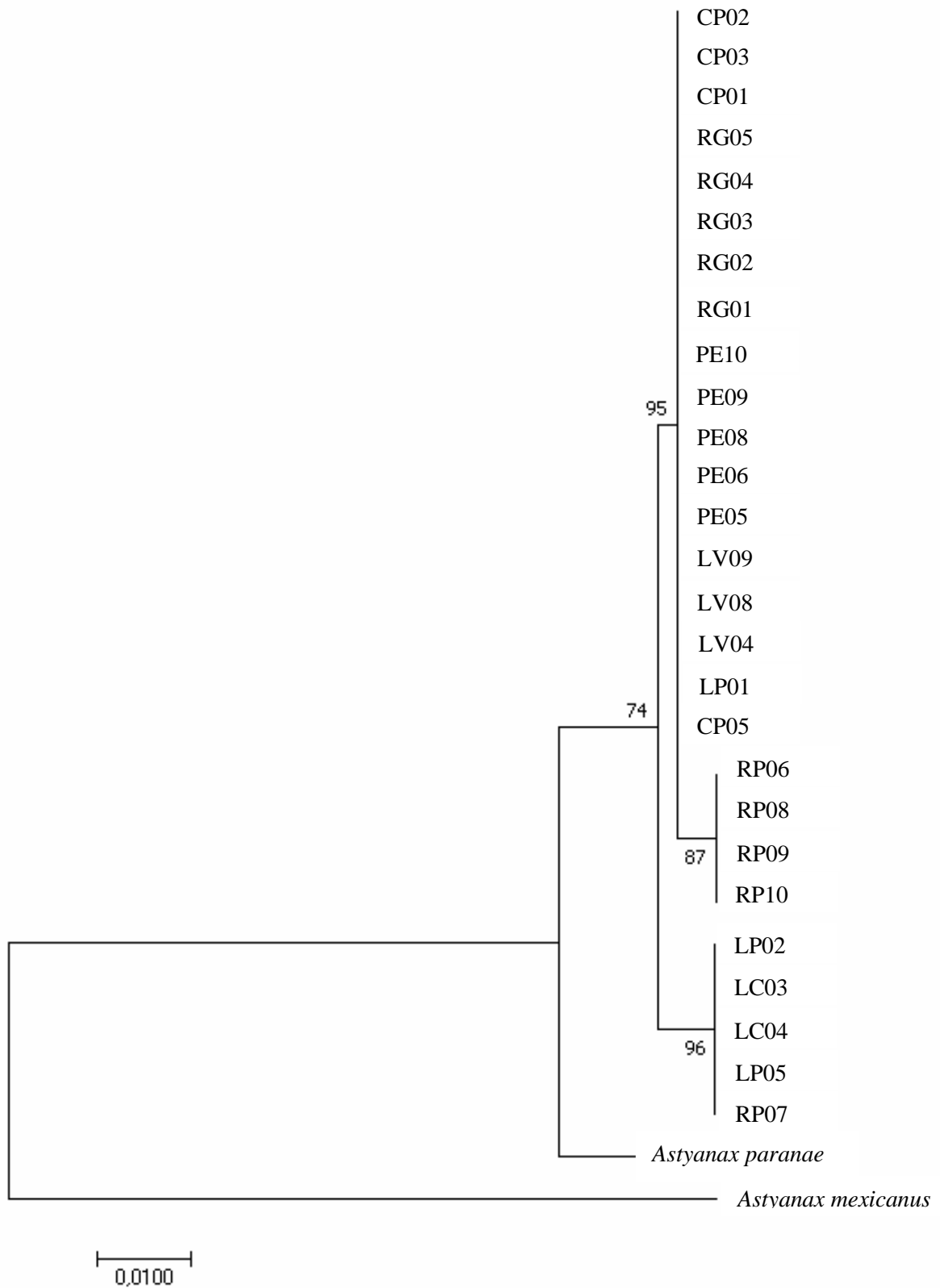


Figura 11 - Árvore de máxima verossimilhança, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

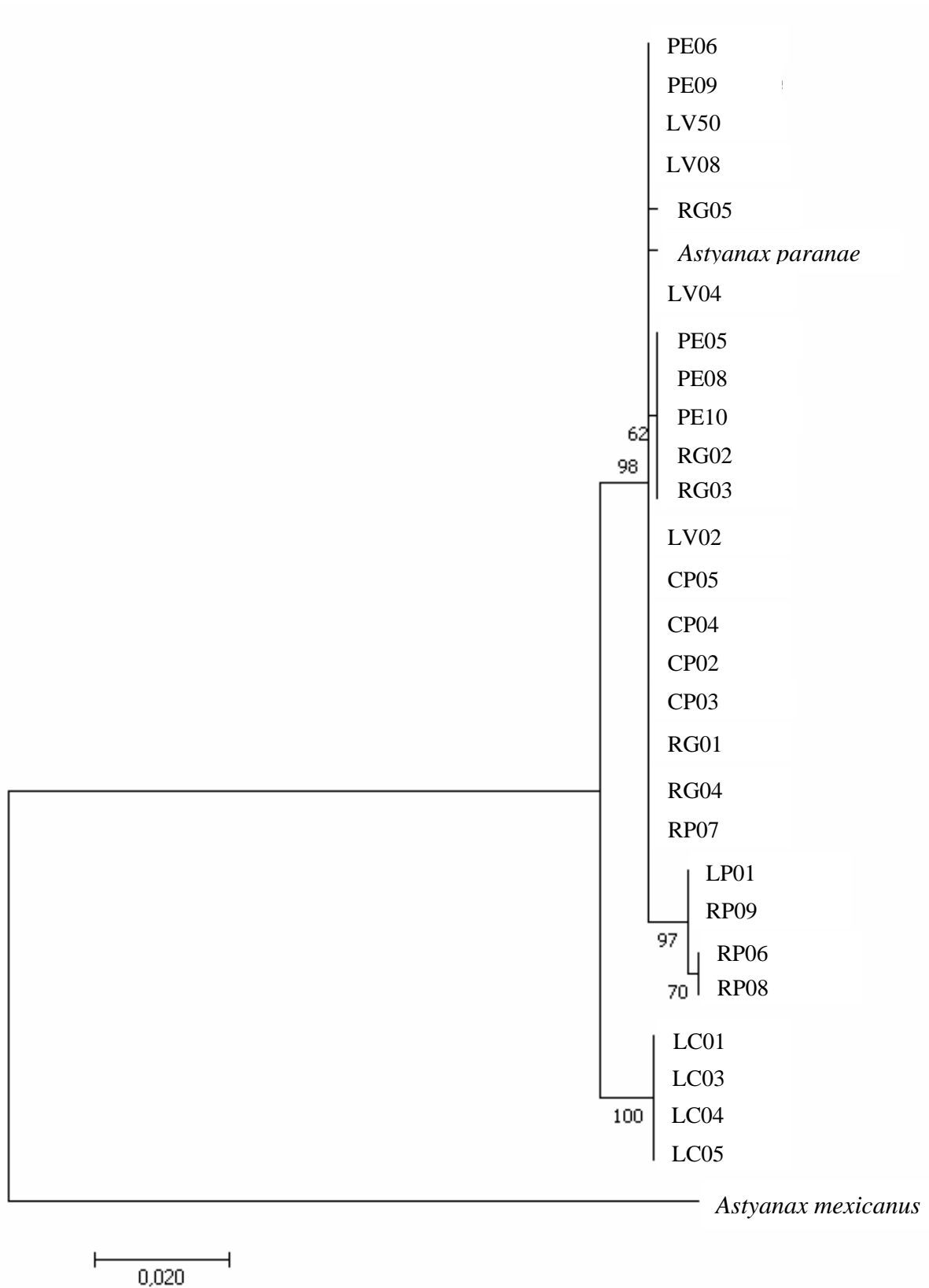


Figura 12 – Árvore de máxima verossimilhança, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

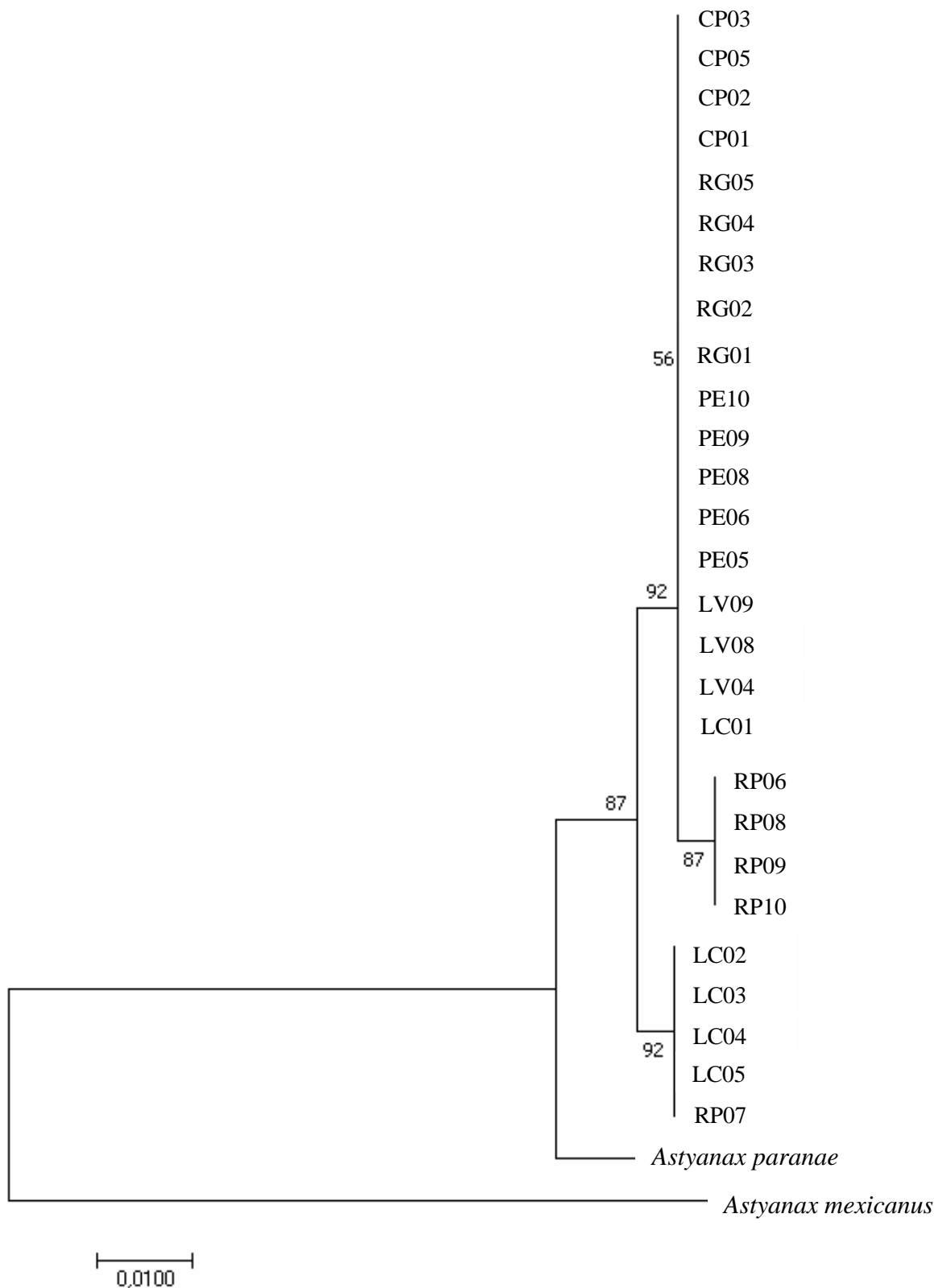


Figura 13 – Árvore de *neighbor-joining*, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

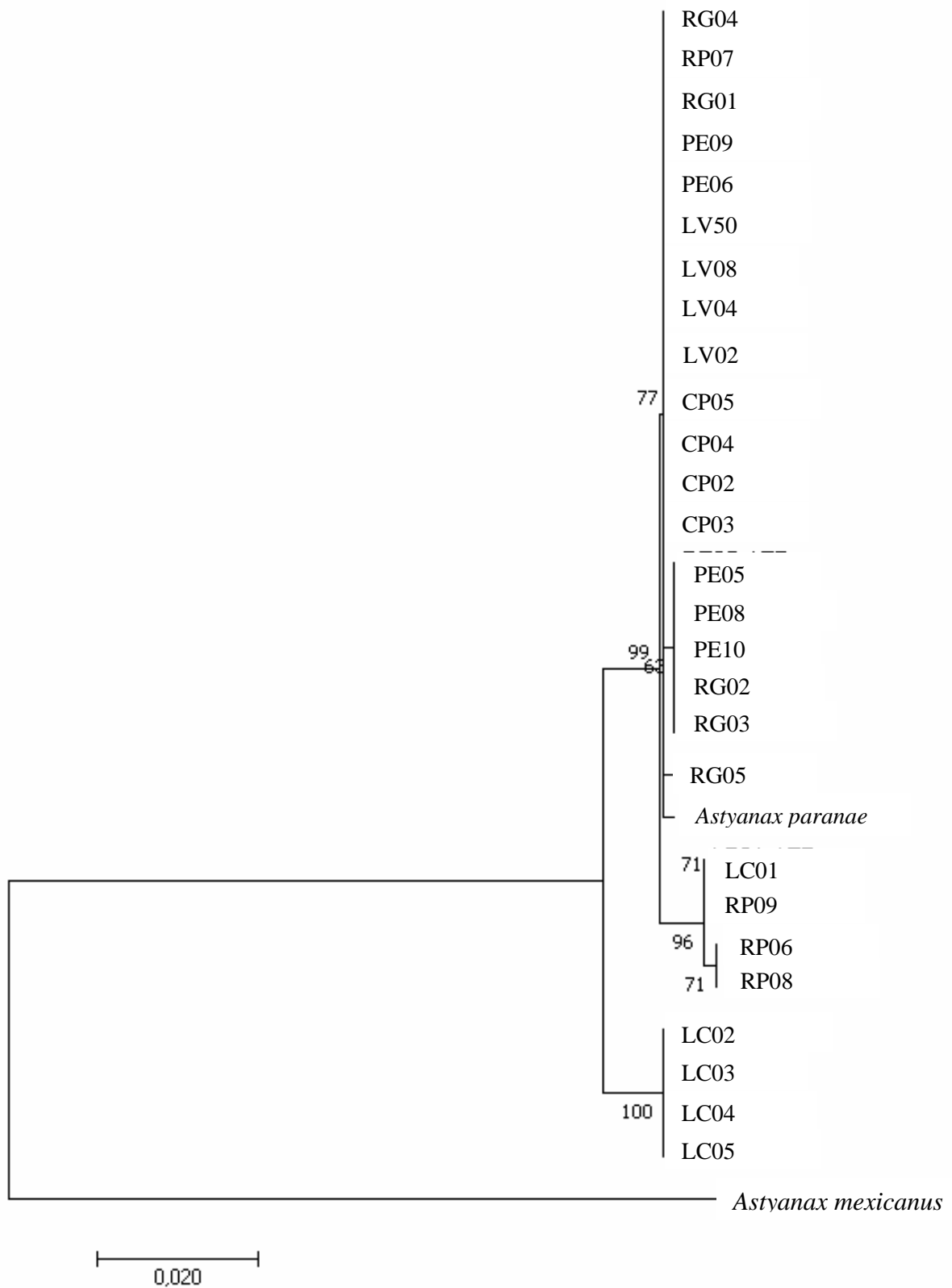


Figura 14 – Árvore de *neighbor-joining*, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

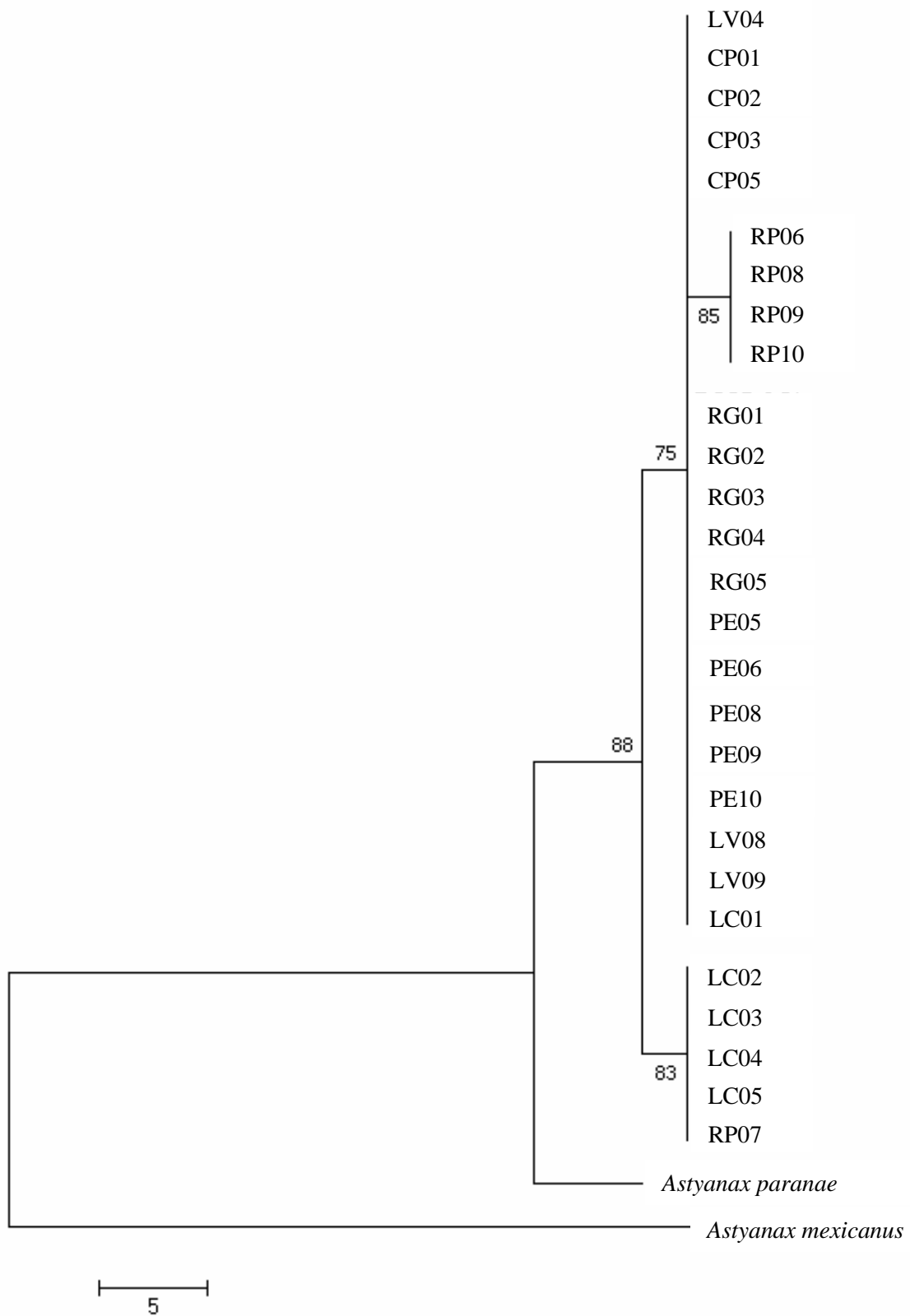


Figura 15 – Árvore de máxima parcimônia, estimada pelo gene mitocondrial COI, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira.

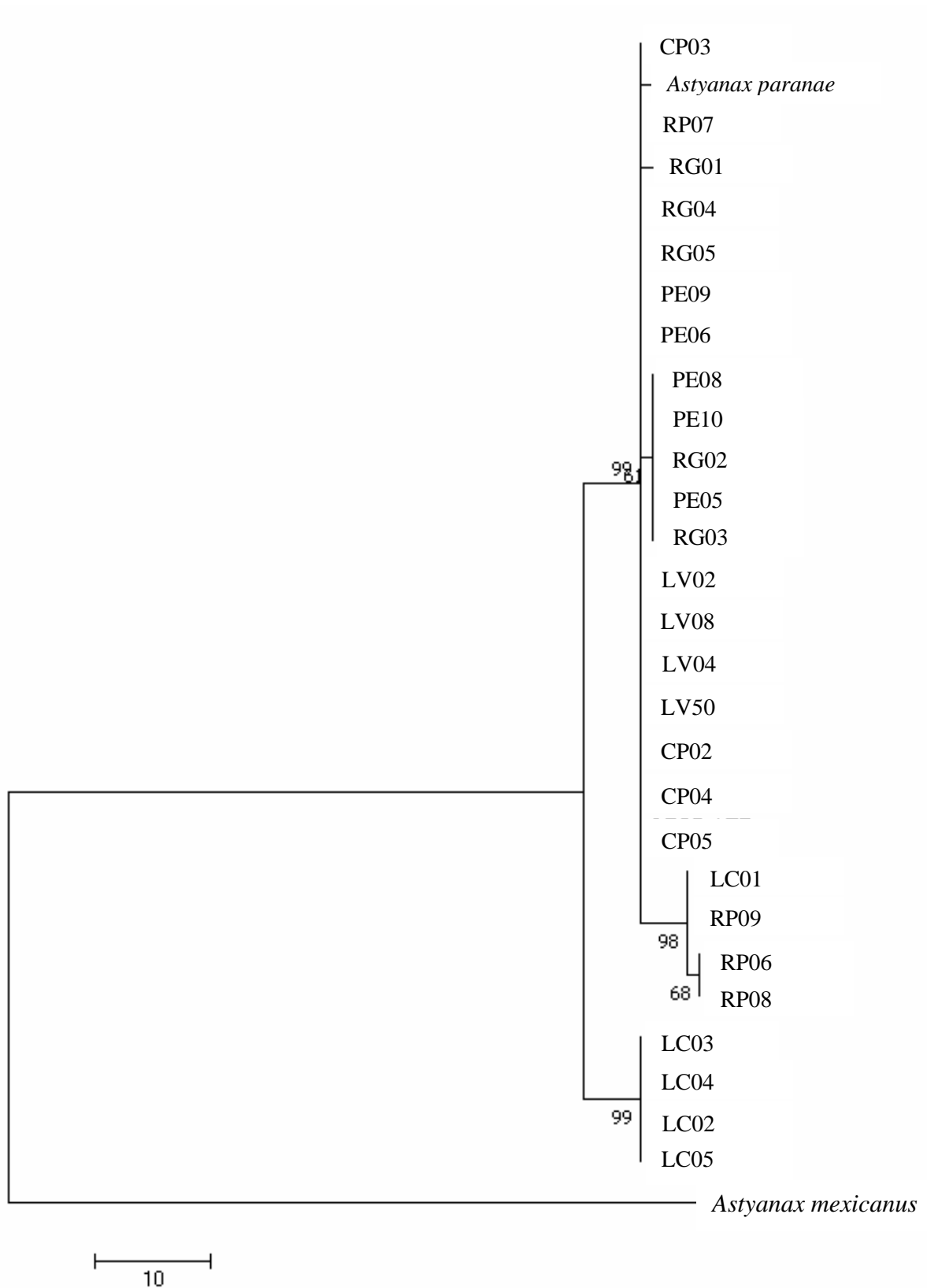


Figura 16 – Árvore de máxima parcimônia, estimada pelo gene mitocondrial ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira

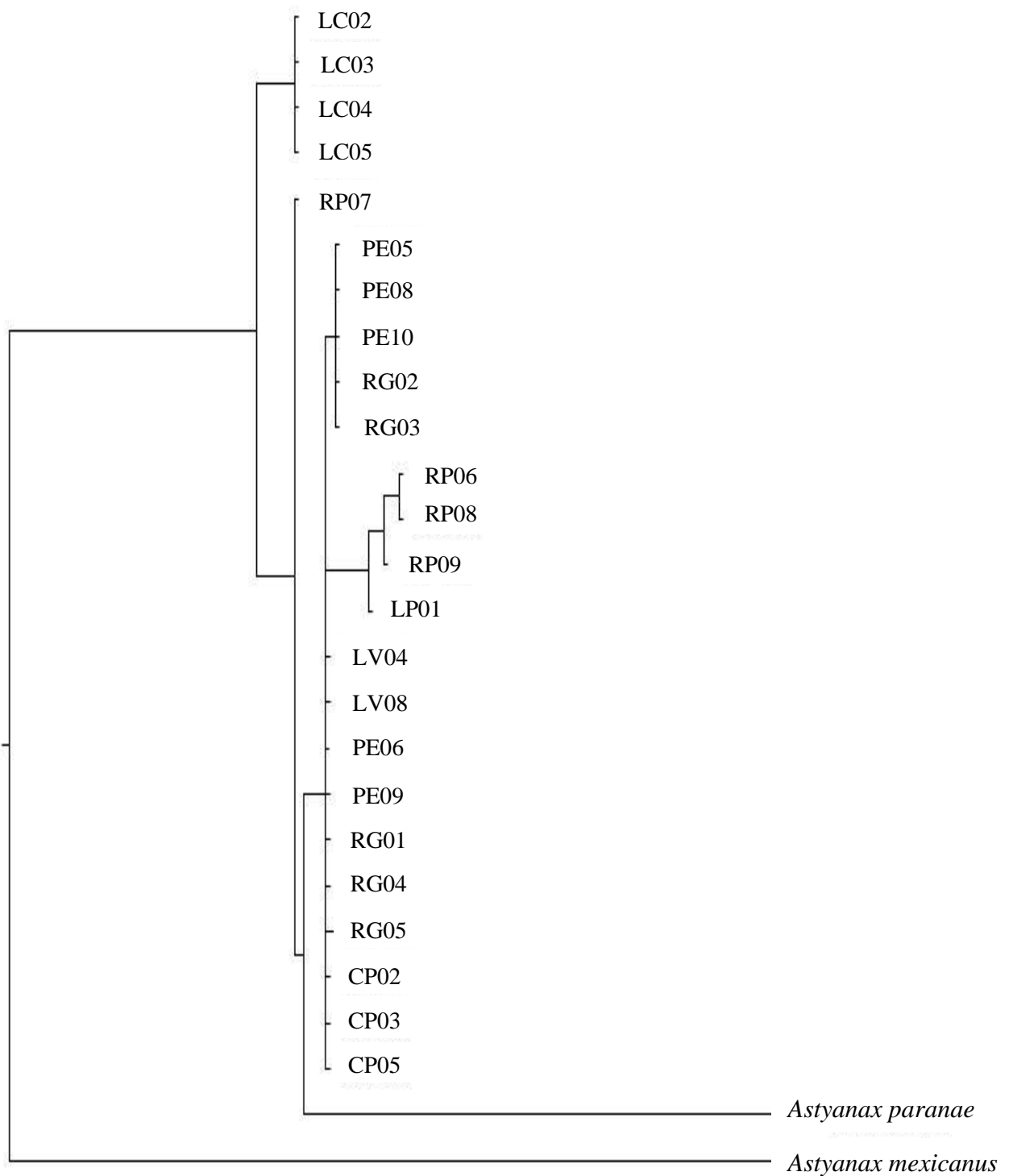


Figura 17 – Árvore de inferência bayesiana concatenada, estimada pelos genes mitocondriais COI e ATPase, das relações filogenéticas entre seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira

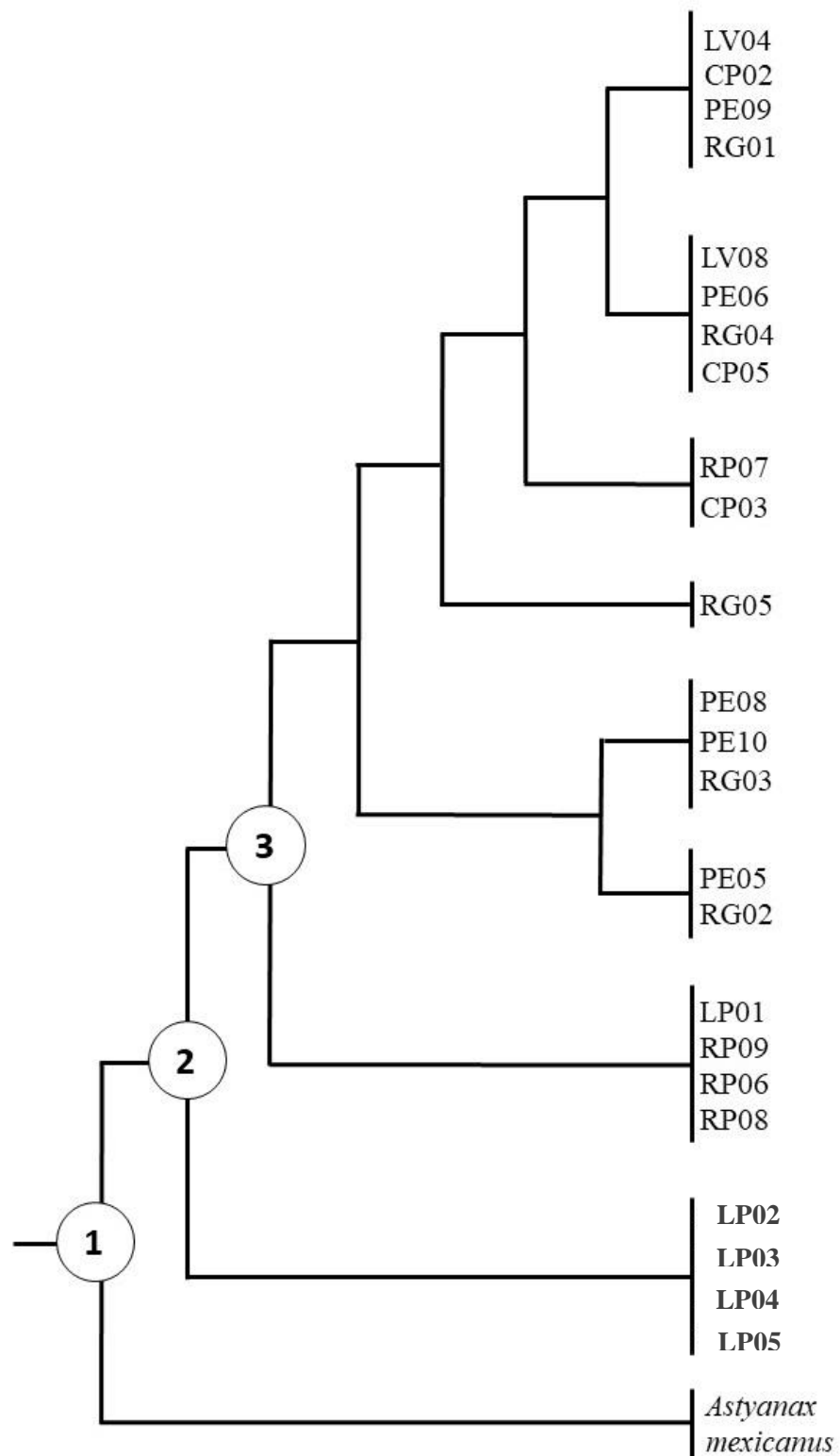


Figura 18 – Árvore de inferência bayesiana gerada pelo software BEAST 2, para seis populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira, onde 1 representa 3,5 milhões de anos, 2 representa 220 mil anos e 3 representa 25 mil anos.

6 DISCUSSÃO

A grande complexidade do gênero *Astyanax* há muito tem sido investigada, com diversos marcadores, na busca da elucidação dos problemas filogenéticos e de conservação. Recentemente, o uso do DNA *Barcoding*, um fragmento de em torno 620 pb do gene que codifica a subunidade I da enzima Citocromo C Oxidase, tem auxiliado diversos pesquisadores a resolver problemas de taxonomia, tais como o limite entre espécies (HEBERT et al., 2003). Diversas metodologias têm sido empregadas para a identificação de espécies de peixes neotropicais, com valores de corte de 1%, 2% e até 3% (PEREIRA et al., 2011a; PEREIRA et al., 2011b; CARVALHO et al., 2011). Em recente revisão molecular do gênero, Rossini et al. (2016) utilizaram divergências maiores que 2% para a discriminação de espécies de *Astyanax*, entre outras metodologias, e ao formarem clados, a menor média das divergências encontradas entre espécies de um mesmo clado foi 3,36 %. Valores bem menores do que os apresentados pelas populações deste trabalho.

De maneira semelhante, as análises utilizando diferentes metodologias de reconstrução filogenética (máxima verossimilhança, máxima parcimônia e *neighbour-joining*) demonstraram, utilizando o COI como marcador, uma nítida separação entre as populações de *Astyanax* aff. *scabripinnis* da Serra da Mantiqueira e *A. paranae*, mesmo sendo espécies bastante relacionadas. Rossini et al. (2016) analisaram mais de cem possíveis táxons do gênero *Astyanax* através do gene COI. *A. scabripinnis* e *A. paranae* foram agrupados em um clado com distância genética de, no geral, 4%. De forma mais específica, neste clado, formaram um grupo com distância genética de 2% (valor de corte), juntamente com outras espécies como *A. fasciatus* e *A. rivularis*.

Astyanax scabripinnis e *A. altiparanae* são espécies geneticamente aproximadas e que provavelmente passaram por um processo de irradiação não tão longínquo (ROSSINI et al., 2016). Espera-se que, para espécies cuja a diversificação evolutiva é recente, a amplificação cruzada de *primers* de microssatélites seja de fácil ocorrência, pois deve haver um bom grau de conservação para essas regiões (GOLDSTEIN et al., 1995; GOLDSTEIN e POLLOCK, 1997). Foi o que ocorreu quando testada a amplificação cruzada de *primers* de *A. altiparanae* para *A. aff. scabripinnis*, já que todos os *primers* amplificaram, porém nem todos resultaram em bons géis para a análise, por apresentarem algumas bandas inespecíficas. Contudo, os resultados mostraram que a transferibilidade de *primers* para *A. aff. scabripinnis* é uma potencial estratégia

para estudos genéticos-populacionais nessas e em outras populações, bem como para outras espécies do gênero. Na ocasião da descrição destes *primers*, Zaganini et al. (2012) testaram a amplificação cruzada para outras seis espécies de *Astyanax*, duas espécies de *Brycon* e uma espécie de *Salminus* (*A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. fasciatus*, *A. jacuhiensis*, *A. abramis*, *A. schubarti*, *A. ribeirae*, *S. brasiliensis*, *B. amazonicus* e *B. hilarii*). Dentre as espécies de *Astyanax*, constataram que pelo menos nove *primers* foram efetivos e que 67% dos *loci* amplificados demonstraram-se polimórficos.

Desde o início da utilização dos microssatélites como marcadores para o estudo genético de populações, a amplificação cruzada (ou utilização de *primers* heterólogos) tem sido utilizada e recomendada entre espécies filogeneticamente aparentadas (MOORE et al., 1991; ASHLEY e DOW, 1994). Segundo Oliveira et al. (2006), a utilização de *primers* heterólogos e/ou a amplificação cruzada é uma importante ferramenta no estudo de populações, principalmente em populações onde os microssatélites são difíceis de isolar. Contudo, a utilização de *primers* heterólogos, embora propicie a economia de tempo e de recursos, eleva a probabilidade de ocorrência de alelos nulos. Isso ocorre pelo fato de que as regiões flanqueadoras podem conter mutações, o que diminui a eficiência dos *primers*, ou seja, diminui a frequência de anelamento. A consequência disso é que alguns fragmentos falham em amplificar, originando os alelos nulos (CHAPUIS e ESTOUP, 2007).

Uma alternativa estatística para enfrentar os problemas causados pelos alelos nulos é o ajuste dos genótipos. Este não modificou essencialmente os índices de diversidade genética das populações, nem os padrões de diferenciação ou estruturação entre as populações. Porém, tornou mais clara a análise dos níveis de heterozigosidade e dos Equilíbrios de Hardy-Weinberg, demonstrando assim, os níveis de endogamia mais próximos da realidade. Segundo vanOosterhut et al. (2004) a presença de alelos nulos causa erros na interpretação de dados, enviesando as análises e impossibilitando a diferenciação entre desvios do EHW, efeito Wahlund e endogamia. Contudo, a grande maioria dos trabalhos que encontram alelos nulos em suas análises (cerca 90%) não utilizam nenhum tipo de correção (DAKIN e AVISE, 2004).

Strecker et al. (2003), utilizaram seis *loci* de microssatélites para estudar a variabilidade genética de oito populações de *Astyanax* (provavelmente *A. mexicanus*), quatro de superfície e quatro de caverna. Utilizando duas fórmulas diferentes para estimar as frequências esperadas de alelos nulos (CHAKRABORTY et al., 1992; BROOKFIELD, 1996), encontraram valores que variaram de 0,4% a 20,6% em todos os *loci*. Também com *A. mexicanus*, Bradic et al. (2012) detectaram a prevalência de alelos nulos em um dos *loci*, pois sua frequência se repetia

em todas as populações analisadas. Nenhum dos *loci* utilizados neste trabalho apresentou alelos nulos em todas as populações, porém dois *loci* só não apresentaram alelos nulos em uma das populações.

Olhando para as populações estudadas nesse trabalho, nenhuma delas apresentou alelos nulos em todos os *loci*, porém CP e LV somente não apresentaram em um dos *loci*. O método utilizado pelo programa MICRO-CHECKER para detectar os nulos baseia-se no significativo déficit de heterozigotos relativamente ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, espera-se que a presença dos alelos nulos esteja relacionada com desvios significativos do EHW. Foi o que ocorreu com ambas as populações: CP somente não apresentou nulos no *locus* 23, enquanto LV somente não os apresentou no *locus* 26. Após o ajuste dos genótipos, CP ainda permaneceu com três *loci* fora do EHW, o que indica a presença, nesta população de algum fator evolutivo que a está levando ao desequilíbrio, como a migração por exemplo. Segundo Chapuis e Estoup (2007) a presença dos alelos nulos pode ser determinada pelo déficit de heterozigotos (pelo desvio do EHW), se não há outro fator evolutivo interferindo na evolução das populações. Considerando que os marcadores de microssatélites são, por definição neutros, o que não favoreceria a seleção destes, fatores como migração ou pequeno tamanho populacional podem estar afastando a população CP do equilíbrio. De fato, como será discutido mais adiante, há evidências de fluxo gênico da população PE para CP. Já na população LV, com o ajuste dos genótipos, nenhum *locus* apresentou-se fora do equilíbrio. Desta forma, permanece a dúvida se a presença de alelos nulos é devida a falhas de amplificação durante as reações de PCR ou se é devida a desvios significativos do EHW. Neste caso, é necessário analisar outros fatores que, podem estar agindo nessa população e levando aos desvios. Uma hipótese, que também será discutida adiante seriam os fortes indícios de migração de RG para LV, reforçado pelos eventos recentes de capturas de drenagem no Córrego Lavrinhas (MODENESI-GAUTTIERI et al., 2002).

Um dos parâmetros mais relevantes para o estudo da estruturação entre as populações, os valores pareados de F_{ST} , não tiveram alteração significativa com o ajuste pelo método ENA (*excluding null alleles*). Este método proposto por CHAPUIS e ESTOUP (2007) e implementado pelo programa FREENA (dos mesmos autores) diminui o viés causado pela presença dos alelos nulos na diferenciação genética entre as populações, mensurada pelo F_{ST} . Os valores sem o ajuste pelo método ENA (dados não mostrados) e após o ajuste, embora numericamente diferentes, representaram as mesmas diferenças genéticas entre as populações, quando estas foram visualizadas par a par.

O método ENA tem sido usado para melhor entender a estruturação genética de populações de peixes, tanto de grandes migradores quanto de peixes de riachos (VERA et al., 2010; FERREIRA et al., 2017). Jaisuk e Senanan (2018) trabalhando com peixes de pequenos corpos d'água, detectaram a presença de alelos nulos em todos os *loci* utilizados, com frequências variando de 0,05 a 0,24. Para estes autores, a utilização do método ENA alterou suavemente os valores de F_{ST} , revelando de forma mais clara a diferenciação entre as populações.

Embora bastante estudados com marcadores cromossômicos, as populações de *A. aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira ainda não haviam sido estudadas em nível molecular. De forma semelhante, ainda pouco se sabia sobre seus *status* conservação genética. Na verdade, são extremamente raros os trabalhos que acessam a variabilidade genética de populações de *Astyanax* com dados de microssatélites.

Para se ter uma ideia mais clara do que representa a variabilidade genética obtida por esse estudo, foi feita revisão em diversas bases de dados usando os descritores “*Astyanax*” e “*microsatellites*” e apenas cinco trabalhos que aliam peixes desse gênero com estudo de variabilidade genética utilizando microssatélites foram encontrados. A tabela 10 mostra as médias arredondadas para duas casas dos valores de heterozigosidades e riqueza alélica levantados dos trabalhos com populações de *Astyanax*. Dentre estes, estão o estudo com 13 populações de *A. altiparanae* (ZAGANINI, 2013) e as muito bem estudadas populações de *A. mexicanus*. A comparação de *A. aff. scabripinnis* com seus congêneres revela que as populações aqui estudadas possuem níveis de heterozigosidade relativamente elevados, bem como bons valores de diversidade alélica.

Astyanax mexicanus formam populações que podem habitar águas superficiais e cavernas, formando pequenos grupos com baixo fluxo gênico (PROTAS et al., 2006), possuindo, portanto, história natural semelhante às populações de *A. aff. scabripinnis*. Panaram e Browsky (2005), analisaram populações de *A. mexicanus* com dados de microssatélites e observaram que a heterozigosidade de populações que eles classificaram como pequenas variou de 0 a 0,254, enquanto que em populações grandes variou de 0,139 a 0,656. Outros trabalhos com a mesma espécie, revelaram populações com enorme variação dos níveis de heterozigosidade observada: 0 a 0,905 (STRECKER et al., 2003), 0,39 a 0,82 (BRADIC et al., 2012). Zaganini (2013) avaliou a diversidade genética de 13 populações de *Astyanax altiparanae* na bacia do Alto Rio Paraná e obteve altos níveis de heterozigosidade, variando de 0,618 a 0,801 e, para todas as localidades, um déficit de heterozigotos.

Quando se compara os valores de heterozigidade observada das populações de *A. aff. scabripinnis* aqui estudadas, que variam de 0,563 a 0,698, nota-se que são relativamente altos e menos variáveis do que as heterozigidades das populações de *A. mexicanus*. Interessante aqui também destacar que em todos esses estudos a maioria das populações demonstraram déficit de heterozigotos.

Tabela 10 – Média das heterozigidades observadas e esperadas (acima) e valores de variação (abaixo) e número de alelos de cinco trabalhos que utilizaram populações de *Astyanax* como modelos de estudos populacionais (valores arredondados)

	H _O	H _E	N _A	
<i>Astyanax</i>	0,43	0,80	20,33	Strecker, 2003
<i>mexicanus</i>	0,27-0,56	0,61-0,89		
<i>Astyanax</i>	0,45	0,49	6,23	Strecker et al., 2003
<i>mexicanus</i>	0,20-0,71	0,23-0,87		
<i>Astyanax</i>	0,35	-	-	Panaram e Borowsky, 2005
<i>mexicanus</i>	0-0,66	-	-	
<i>Astyanax</i>	0,59	0,62	6,25	Bradic et al., 2012
<i>mexicanus</i>	0,39-0,82	0,40-0,85		
<i>Astyanax</i>	0,74	0,84	15,35	Zaganini, 2013
<i>altiparanae</i>	0,62-0,80	0,69-0,89		

H_O: heterozigidade observada, H_E: heterozigidade esperada, N_A: número de alelos, acima

A variabilidade genética do gênero *Astyanax* foi também acessada anteriormente com outros marcadores genéticos (não cromossômicos), embora os trabalhos sejam escassos. Peres et al. (2005), utilizando isoenzimas, observaram valores médios de heterozigidade variando de 0,073 a 0,075 e número médio de alelos entre os *loci* polimórficos 2,09, em duas populações de *A. altiparanae*, na bacia do Rio Paraná. Para essas populações a heterozigidade esperada variou entre 0,09 e 0,15. Um outro trabalho utilizando populações identificadas como *A. scabripinnis*, de três diferentes pontos de coleta no mesmo corpo d'água, com RAPD identificou valores de heterozigidade esperada variando entre 0,24 a 0,25 (SOFIA et al., 2006). Embora essa população tenha sido identificada como *A. scabripinnis*, trata-se de uma unidade evolutiva diferente daquela aqui estudada, porém com história natural muito semelhante.

A comparação do número de alelos obtidos nesse trabalho com outros *Astyanax*, mostra razoável riqueza alélica para o gênero. A variação do número de alelos aqui obtida, varia de 4,8 a 9,8, em média para as seis populações, enquanto que em outros *Astyanax* os números variam de 2,67 a 15 em *A. mexicanus* (STRECKER et al., 2003), 2,23 a 11,96 também em *A. mexicanus* (BRADIC et al., 2012) e 6,4 a 20,25 em *A. altiparanae* (ZAGANINI, 2013). Embora alguns

dos trabalhos com *Astyanax*, citem o número de alelos, mas não riqueza alélica, este último é um parâmetro mais informativo para a comparação da diversidade entre as populações, já que aplica um fator de rarefação (revisado por FOULLEY e OLLIVIER, 2006). Essa comparação mostra que os valores aqui obtidos (4,591 a 7,783) estão dentro da variação encontrada para o gênero. Por exemplo pode-se citar, a variação entre as médias das riquezas alélicas de 1,21 a 5,21 em *A. mexicanus* (PANARAM e BOROWSKI, 2005), de 1,89 a 3,83 também em *A. mexicanus* (BRADIC et al., 2012) e de 5,97 a 12,81 em *A. altiparanae* (ZAGANINI, 2013).

Pode-se notar, pela comparação dos níveis de heterozigosidades e riquezas alélicas que as populações de *A. altiparanae* possuem maior diversidade genética do que outras populações de *Astyanax*. *A. altiparanae* é uma espécie com boa capacidade natatório e capaz de realizar migrações (CASTRO et al., 2003). Espécies migradoras possuem maior resiliência a perda de diversidade genética e, por isso, costumam a apresentar maior índices de diversidade genética (FREELAND, 2005; ADAMSON, HURWOOD e MATHER, 2012). De fato, diversos trabalhos têm reportado índices de diversidade genética relativamente altos para espécies de peixes neotropicais migradoras. Ferreira et al. (2016), trabalhando com *Prochilodus lineatus*, observaram valores de heterozigosidade variando de 0,63 a 0,822 e valores de riqueza alélica de 9,86 a 11,79. Matsumoto e Hilsdorf (2009), observaram altas heterozigosidades em *Brycon insignis* (de 0,77 a 0,88) e valores de riqueza alélica variando de 5,32 a 7,97, originários de bacias costeiras, incluindo a bacia do Paraíba do Sul. A migração promove a troca de alelos, e por isso mantêm grandes tamanhos efetivos populacionais. Desta forma, mesmo populações de grandes peixes migradores, quando isoladas por hidroelétricas por exemplo, tendem a perder heterozigosidade – efeito da estruturação e da endogamia. Exemplo disso, é o que mostrou o trabalho de Ashikaga et al. (2009), onde populações de *Brycon orbignyanus* apresentaram baixos níveis de heterozigosidades para peixes migradores (H_o variando de 0,198 a 0,498) e altos níveis de endogamia, mesmo com relativamente altas médias dos números de alelos (6,5 a 18).

Já, quando se compara a heterozigosidade, a riqueza alélica e os níveis de endogamia de *A. aff. scabripinnis*, com outras espécies de peixes de natureza sedentária, como *Geophagus braziliensis* por exemplo, nota-se valores mais semelhantes. Ferreira et al. (2015) encontram valores de heterozigosidade variando de 0,474 a 0,628, valores de riqueza alélica variando de 3,56 a 4,11 e valores negativos de F_{IS} para somente duas das populações, em *G. braziliensis* coletados em seis pontos diferente de um mesmo Rio na bacia do Alto Paraná. Jaisuk e Pananan (2018) estudando populações de *Garra cambodgiensis*, um pequeno ciprinídeo asiático,

encontraram valores de heteroziguidade que variaram de 0,51 a 0,65, enquanto os valores de riqueza alélica variaram de 8 a 13,36. Também encontraram valores positivos e F_{IS} para todas as populações.

Dentre as populações aqui estudadas, somente duas delas - LC e RP - não apresentaram déficit de heterozigotos ($F_{IS} = -0,029$ e $-0,057$, respectivamente). Segundo Hartl e Clark (2010), a subdivisão de populações pode levar ao aumento da endogamia, o que, por consequência, elevaria a homoziguidade e reduziria a heteroziguidade. Desta forma, grandes populações que apresentam subdivisões tendem a apresentar déficit de heterozigotos nos isolados populacionais, num contexto de EHW, fenômeno conhecido como efeito Wahlund. Esse efeito é comum em populações de peixes isoladas por barreiras naturais que se encontraram em virtude do rompimento das barreiras. Em *Astyanax mexicanus*, o isolamento entre populações de superfície e populações de caverna, é um exemplo disso (BRADIC et al., 2012). Fenômeno semelhante pode ser encontrado em peixes migradores. Ferreira et al. (2016) estudando populações de *Prochilodus lineatus* isoladas em pequenos trechos por barreiras intransponíveis, tais como as Cataratas do Iguaçu, também atribuíram o déficit de heterozigotos ao efeito Wahlund.

Diversas evidências obtidas, tanto com dados mitocondriais, quanto com microssatélites, demonstram a origem afim das populações RG, LV, PE e CP. Os dados obtidos parecem indicar que trata-se na verdade de uma grande população (metapopulação), dividida recentemente (em termos de tempo geológico) em quatro subpopulações. Desta forma, o efeito Wahlund poderia explicar o déficit de heterozigotos em todas elas.

Reduções do tamanho efetivo populacional estão frequentemente ligadas a gargalos genéticos populacionais, os chamados *bottlenecks*. Neste cenário, a diversidade genética tende a diminuir, levando a um aumento na endogamia e diminuindo a viabilidade das populações (SPENCER et al., 2000). Segundo Cornuet e Luikart (1996), durante o *bottleneck*, a diversidade alélica, medida através da riqueza alélica e do número de alelos, é inicialmente afetada devido à perda de alelos, causando a chamada deficiência alélica. Desta forma, a diversidade alélica observada é menor do que a diversidade esperada em relação a heteroziguidade observada, fenômeno conhecido como excesso de heteroziguidade. O excesso de heteroziguidade é identificado de acordo com Nei (1987) e é diferente do excesso de heterozigotos, calculado de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (CORNUET e LUIKART, 1996). O programa BOTTLENECK mostrou que há evidência de excesso de heteroziguidade para as populações PE e RG ($P < 0,05$). Estas também apresentaram pequenos tamanhos efetivos populacionais

(10,7 e 16,9, respectivamente, os dois menores entre as seis populações, desconsiderando RP) e os dois menores valores de diversidade alélica. Além disso, ambas as populações também apresentaram indícios de endogamia ($F_{IS} = 0,103$ e $0,207$, respectivamente).

Comparando PE e RG com as outras populações de *A. aff. scabripinnis* deste trabalho e com as populações congêneres citadas acima, pode-se notar que possuem baixos níveis de diversidade alélica (número de alelos, número efetivo de alelos e riqueza alélica) e indícios de endogamia. De forma semelhante, os dados de DNA mitocondrial apontam que estas duas populações possuem baixos níveis de diversidade tanto haplotípica como nucleotídica para o gene COI e moderadas para ATPase. O conjunto desses fatores, aliados ao pequeno tamanho efetivo populacional (N_e), são indícios de que ambas as populações passaram por *bottlenecks*. Segundo Cornuet e Luikart (1996) quando uma população entra em gargalo genético, causado pela redução do tamanho efetivo populacional, a endogamia leva, inicialmente, à perda de diversidade alélica. O que se esperar nos próximos passos, é que surja um excesso de heterozigiosidade (de acordo com Nei, 1987) ou seja, o número observado de alelos é menor do que se esperaria para a heterozigiosidade observada. Por último, espera-se que a heterozigiosidade diminua. Desta forma, pode-se inferir que os eventos de gargalo de PE e RG, se tiverem sido causados pela separação entre ambas, são recentes, pois ainda apresentam níveis de heterozigiosidade observada moderados. Dentre as populações desse trabalho, outras também apresentam relativamente altos níveis de endogamia ou baixos tamanhos efetivos populacionais, respectivamente CP e RP, por exemplo. Porém, a diversidade alélica nestas populações é alta e provavelmente por isso não apresentaram indícios de *bottleneck*. Contudo, deve-se destacar que a população RG foi a de menor número amostral, fator esse que pode ter influenciado no resultado.

Diversos estudos vêm demonstrando que a fragmentação de habitats, eventos climáticos como seca ou até mesmo eventos geológicos vicariantes são causadores de gargalos genéticos populacionais (HAPONSKI e STEPIEN, 2004; BRADIC et al., 2012; ANDERSEN et al., 2017). Alguns exemplos de redução do tamanho das populações foram extensamente estudados e aumentaram o conhecimento da ciência acerca dos efeitos de um gargalo genético. Pode-se citar como exemplo a população dos guepardos sul-africanos *Acinomyx jubatus jubatus* que, em sua história evolutiva recente teve uma severa redução em tamanho, o que ocasionou endogamia e, quando comparados a outros felinos, uma drástica redução da fertilidade, causada por anomalias nos espermatozoides (O'BRIEN et al., 1985). Em peixes, a diminuição dos tamanhos populações pode ser melhor detectada em espécies de alto interesse comercial, bem

como os efeitos genéticos dessa diminuição. Vera et al. (2010) estudaram seis populações de truta (*Salmo trutta caspius*) e detectaram gargalo populacional para uma delas. Essa população também apresentou baixa diversidade genética o que, segundo os autores, pode ser sido ocasionada por sobre-exploração da pesca, poluição ou destruição dos locais de desova. Ferreira et al., (2014) detectaram indícios de gargalo em cinco de seis populações de *Geophagus braziliensis* estudadas. A única população que não apresentou *bottleneck* é a que está no ambiente menos antropizado.

Os valores de F_{ST} pareados mostraram que a população LC é a mais diferente de todas as outras, seguida da população RP. Entre LC e as outras populações, esses valores variaram de 0,196 a 0,317, enquanto que os valores entre RP e as outras populações variaram de 0,114 a 0,264. Embora essa seja uma relação bastante simples, Wright (1978) sugere que valores entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação grande entre as populações e valores maiores que 0,25 indicam diferenciação muito grande. Neste caso, a diferenciação entre LC e as outras populações é grande ou muito grande e de RP em relação as outras é moderada ou grande. Além disso, a maior parte desses valores está acima da média global ($F_{ST} = 0,144$). Para se ter uma ideia mais clara dessas diferenças, pode-se citar os trabalhos com *Astyanax mexicanus*, onde o maior valor de F_{ST} entre duas populações foi 0,51 e o menor 0,01 (BRADIC et al., 2012). Já entre populações de *A. altiparanae*, Zaganini (2013) encontrou valores variando entre 0,001 e 0,114, mostrando que, em espécies migratórias a estruturação genética tende a ser menos evidente.

Os resultados da inferência Bayesiana para a investigação de estruturação populacional, realizada pelo programa STRUCTURE aponta no mesmo sentido das estatísticas-F. A presença da população LC quando analisada junto com as outras, sem informação de localidade *a priori*, acaba por enviesar a análise tornando a diferença entre as outras cinco populações quase que imperceptível. A metodologia sugerida por Coulon et al. (2008) foi eficaz ao mostrar a estruturação das populações, tornando mais clara as diferenças entre elas, além disso foram ao encontro dos demais resultados (AMOVA e PCoA). Quando a população LC foi retirada da análise, três grupos genéticos (ou *clusters*, $K = 3$) foram detectados. Neste caso, nota-se que as populações RP e CP estão mais distantes geneticamente do grupo formado por PE+RG+LV. Os resultados das análises das coordenadas principais (PCoA) e F_{ST} apontam no mesmo sentido. Nota-se, por essa análise, a clara aproximação de PE, RG, LV e CP e distanciamento de LC e RP.

Desta forma, a simples hipótese de hierarquização das populações de *A. aff. scabripinnis*

na Serra da Mantiqueira em dois grupos equivalentes às duas bacias, parece não explicar a variação genética entre elas. Foi o que a Análise da Variância Molecular (AMOVA) mostrou utilizando os microssatélites e o DNA mitocondrial. Ao testar essa hipótese, tanto com os dados de microssatélites quanto com o DNA mitocondrial, a variação entre as populações dentro das bacias foi maior do que entre as bacias, ou seja, há maior variação entre uma população e outra dentro de cada bacia do que entre todas as populações de uma bacia comparadas com as populações da outra bacia. Segundo Hartl e Clark (2010), a hierarquização dos dados que realmente revela a estruturação populacional é aquela onde a variação genética entre todas as populações é maior do que a variação entre os grupos de populações (ou bacias, no caso) e esta é maior do que a variação entre as populações dentro dos grupos.

Dentre as hipóteses testadas, a que melhor explica a estruturação ou a variação genética das populações, portanto, é a formação de três grupos: um formado somente pela população LC, outro somente pela população RP e o último formado pelas populações PE, RG, LV e CP. Quando testada com marcadores de microssatélites, essa hipótese mostrou, com valores estatisticamente significativos, que a variação dentro do grupo formado pelas quatro populações é menor do que entre esse grupo e as outras populações. A AMOVA com dados de DNA mitocondrial, tanto para o ATPase quanto para o COI, a exemplo dos microssatélites, mostrou maior variação entre os grupos do que entre as populações dentro dos grupos, também com valores estatisticamente significativos.

Quando se leva em consideração a variação entre todas as populações, desconsiderando a formação de grupos, nota-se que, com os dados de microssatélites, essa variação foi maior do que a variação entre os grupos. Porém, com DNA mitocondrial, a variação entre as populações foi menor do que entre os grupos. Uma provável explicação para isso é que a taxa de evolução dos microssatélites é maior do que do DNA mitocondrial, neste caso a separação recente das quatro populações (PE, RG, LV e CP) pode não ter sido suficiente para acumular significativas diferenças entre elas no DNA mitocondrial, mas já foi suficiente para acumular diferenças que puderam ser visualizadas com marcadores de microssatélites.

A utilização da AMOVA tem se mostrado eficiente para peixes pouco migradores. Bradic et al. (2012) testaram diversas hipóteses de estruturação populacional para os *A. mexicanus* inferidas a partir da diversidade alélica e dos dados do STRUCTURE. A hipótese que melhor explicou a hierarquização dos dados, não agrupou as populações simplesmente em cavernícolas ou de superfície, demonstrando grande complexidade biogeográfica. Em populações cuja a separação geográfica é maior e as barreiras mais difíceis de transpor, as

hipóteses de estruturação podem ser inferidas diretamente dos dados biogeográficos. Por exemplo populações do *killifish* *Aphanius fasciatus* coletados na Grécia e na Turquia e separadas pelo Mar Egeu, apresentaram estruturação genética compatível com a distribuição geográfica (TRANTAFYLLIDIS et al., 2007).

Os dados obtidos, tanto para microssatélites quanto para DNA mitocondrial, demonstraram claramente a diferenciação das populações LC e RP das demais. Olhando mais especificamente para o grupo formado pelas populações (PE, RG, LV e CP), as análises do STRUCTURE e os valores de F_{ST} demonstraram que CP é a mais divergente geneticamente das outras. Essa afirmação também pode ser corroborada pela PCoA e pelo F_{ST} . Já entre PE, RG e LV, esta última é a mais divergente. PE e RG mostram uma diferenciação pequena ($F_{ST} = 0,02$, o menor valor entre os pares de populações), porém como destacado por Wright (1978) não pode ser desconsiderada. A pequena diferenciação entre PE e RG não permite inferir uma estruturação entre as quatro populações em dois grupos correspondentes às duas bacias. Para confirmar essa afirmação, foi realizado a AMOVA testando também essa hipótese (dados não apresentados) o que não resultou em uma estruturação significativa.

O fragmento do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI) demonstrou-se eficiente no estudo das populações de *A. aff. scabripinnis* e na distinção dessas populações de outras espécies. Já o ATPase mostrou nitidamente a separação das populações RP e LC, a exemplo do COI e dos dados de microssatélites, mas não foi eficiente na separação de *A. paranae* das demais populações. Somente na árvore concatenada, produzida através de análise Bayesiana, essa separação foi nítida. Marreta 2011, em trabalho de filogeografia de diversas espécies de *Astyanax*, não conseguiu separar, filogeneticamente, *A. scabripinnis* provenientes da bacia do Leste (Rio Bertioga/SP) de *A. paranae* da bacia do Alto Paranapanema, utilizando o gene ATPase como marcador. Kavalco et al. (2011), encontraram baixos valores de *bootstrap* em árvores construídas com sequências de ATPase de *A. altiparanae* e *A. bimaculatus*, o que, segundo os próprios autores, pode ser devido à grande similaridade entre os haplótipos. Neste caso, o DNA mitocondrial pode não ser sensível o suficiente para evidenciar a irradiações recentes entre grupos (FUNK e OMLAND, 2003), tais como grupos que sofreram rápida especiação (ROSSINI et al., 2016).

Rossini et al. (2016) mostraram a grande proximidade de *A. scabripinnis* e *A. paranae*. Segundo os autores a separação entre ambos os táxons é recente. Nesse estudo da filogenia do gênero *Astyanax*, uma das localidades amostradas foi material do Córrego Lavrinhas (LV deste trabalho), que também ficou no mesmo clado do *A. paranae*, a exemplo dos *A. scabripinnis* da

bacia do Rio Grande. Por outro lado, em recente revisão do grupo *A. scabripinnis*, Oliveira (2017) redescreveu a espécie e propôs que sua área de distribuição é bem maior do que se pensava, abrangendo desde o Uruguai até o Espírito Santo, inclusive o Rio Iguaçu e é sinônimo de *A. laticeps* e *A. serratus*. Em seu trabalho, Oliveira (2017) sugere a extinção nomenclatural do grupo e a adoção da nova distribuição para *A. scabripinnis*. Neste caso, as populações utilizadas nesse trabalho, embora pertençam ao grupo, não seriam de fato *A. scabripinnis*.

As taxas de imigrantes (m) identificadas pelo programa MIGRATE, auxiliam a entender os padrões observados em todas as análises supracitadas. Há grande evidência de fluxo gênico de PE para CP e pequena ao contrário na Bacia do Sapucaí. Evidência reforçada pelo razoável número de *loci* fora do EHW observada em CP. Já na bacia do Paraíba do Sul, há grande evidência de fluxo gênico de RG para LV e moderada ao contrário, também reforçada pelo razoável número de *loci* fora do EHW observada antes do ajuste dos genótipos em LV. Não foram visualizadas evidências significativas de fluxo gênico entre LC e as outras populações da bacia do Sapucaí, nem entre RP e outras populações da bacia do Paraíba do Sul. Em virtude da capacidade computacional limitada disponível para a realização dos testes do MIGRATE, não foi possível testar fluxo gênico das populações da bacia do Sapucaí para o Paraíba do Sul, uma a uma, e vice-versa. Porém é provável que o fluxo gênico da Bacia do Sapucaí para a Bacia do Paraíba do Sul seja de PE para RG. Contudo, deve-se ressaltar que o MIGRATE exige grande capacidade computacional para fazer as análises em tempo hábil e por este motivo, o número de cadeias usadas nesse trabalho foi pequeno. Uma alternativa, seria a utilização dos marcadores mitocondriais, contudo as evidências de hermafroditismo para essas populações (CORNELIO et al., 2013) dificultariam a utilização correta do fator escalar (x) para o cálculo do tamanho efetivo populacional (N_e), que seria diferente de 1 (BEERLI e FELSENTEIN, 2001; BEERLI, 2012).

A análise dos dados geográficos, tais como a distância física entre as populações e o relevo, ajuda a entender essa estruturação e os padrões de migração encontrados. A população RP é a que possui maior distância geográfica das outras populações (veja figuras 4 e 5) além disso, está a 606 metros de altitude, cerca de 1.000 metros a menos que as demais populações. É possível que, durante o soerguimento das bordas cristalinas, ela tenha sido a primeira a separar das demais populações, ficando isolada por mais tempo e há mais tempo tendo deixado de receber alelos das demais populações por migração.

Embora não tenham sido detectados sinais de isolamento por distância, através do teste de Mantel, a comparação entre as distâncias geográfica e o F_{ST} reforça a explicação acima.

Dentro da mesma bacia, os maiores valores de F_{ST} pareados entre RP e uma outra população correspondem também às maiores distâncias geográficas. O mesmo acontece com LC, porém com esta população outros fatores também podem estar envolvidos, como será discutido adiante.

Já a população CP é a mais diferente geneticamente das demais, quando se exclui RP e LC. Dentre as populações da bacia do Sapucaí, CP é a mais distante do divisor das bacias e a que tem menor altitude, excetuando-se LC. A exemplo do que aconteceu com RP, é provável que esta população tenha se isolado a mais tempo do que PE das populações da bacia do Sapucaí. Embora haja indícios de fluxo gênico de PE para CP, mas indícios fracos do contrário, há uma nítida diferença entre elas. O fluxo de PE para CP pode ser explicado pela proximidade geográfica entre ambas. Além disso, a maior altitude de PE em relação a RP pode estar colaborando para os padrões de migração visualizados. Diversos fatores ambientais, fisiológicos ou até mesmo comportamentais podem determinar diferentes tipos de padrões de migração em populações de peixes da mesma espécie.

Seguindo esse raciocínio, o mesmo se aplica a LV que também está mais distante das populações da bacia do Sapucaí e, dentre as da bacia do Paraíba do Sul é a que tem maior altitude. Esses valores, indicam que LV pode ser sido a segunda a separar das outras populações e, pela proximidade com RG ainda mantem migrações. Porém, a diferença de altitude entre RG e LV torna difícil explicar os padrões de migração indicados pelo MIGRATE, já que houve mais evidência de migração de RG para LV do que do contrário. O fato de LV não possuir alelos privados corrobora essa observação. Como RG está a 921 metros de altitude enquanto LV está a 1863 metros não é parcimonioso supor que há mais facilidade de migração da localidade mais baixa para a mais alta do que do contrário. Contudo, muitos outros fatores, além da altitude e bastante difíceis de se determinar, podem influenciar os padrões de migração (FAUSCH et al., 2002). De acordo com Jonsson e Jonsson (1993), indivíduos de uma mesma população apresentam diferentes comportamentos migratórios, por exemplo migradores e residentes, podem ter diferentes taxas de crescimento e fertilidade. Bradic et al. (2012) mostraram que populações cavernícolas recebem mais alelos das populações de superfície do que doam, em *Astyanax mexicanus*. As incursões de peixes da superfície para as cavernas podem ser ocasionadas por vários motivos, inclusive o regime de chuvas. Porém, notaram também que algumas populações de cavernas migram mais do que outras. Os padrões migratórios podem estar contribuindo com a manutenção da variação genética entre as populações da região.

Os dados do relógio molecular demonstraram separação entre *A. mexicanus* e *A. scabripinnis* da ordem de 3,5 milhões de anos, tempo próximo do final da formação do Istmo do Panamá (3,3 milhões de anos). A hipótese de origem sul-americana de *Astyanax*, e outros caracídeos, e posterior colonização da América Central é amplamente aceita (CALCAGNOTTO, SCHAEFER e DESALLE, 2005; REEVES e BERMINGHAM, 2006; ORNELAS-GARCÍA, DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ e DOADRIO, 2011). Contudo não há consenso entre os pesquisadores sobre o tempo de início dessa colonização. Ornelas-Garcia, Dominguez-Dominguez e Doadrio (2011), a partir de dados de sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, encontraram valores para o tempo de colonização entre 7,8 e 8,1 milhões de anos. Para diversos outros autores, a colonização da América Central a partir da América do Sul só foi possível a partir da formação do Istmo do Panamá (STRECKER et al., 2004; REEVES e BERMINGHAM, 2006).

Entre as populações estudadas por esse trabalho, a população do Lago Capivari demonstrou diversificação das demais da ordem de 220 mil anos. Logicamente esse tempo não condiz com atividade humana, mas corrobora a hipótese de introdução de indivíduos de diversas populações a muito isoladas e estruturadas, conforme discutido anteriormente. Já o tempo de separação da população do Ribeirão Pequeno (da ordem de 25 mil anos) é condizente com os movimentos tectônicos recentes, descritos para a região. Fumey et al. (2018) propôs que a colonização de cavernas por *A. mexicanus* é recente (menos que 20.000 anos) e que mesmo em eventos recentes de dispersão pode-se observar diferenças significativas entre populações, mesmo em caracteres morfológicos.

Mas como explicar a grande semelhança entre PE e RG visualizada em todas as análises, tanto com microssatélites quanto com DNA mitocondrial? Ingenito (2004) analisou as ictiofaunas das bacias do Sapucaí e do Paraíba do Sul e a Serra da Mantiqueira como barreira biogeográfica entre ambas. Uma das espécies amostradas com ocorrência em ambas as bacias, foi *Astyanax* sp.1, uma morfoespécie que, segundo o autor pertence ao grupo *A. scabripinnis* e entre as áreas de amostragem, está o Ribeirão Grande (RG). Desta forma, o autor comenta que os pontos mais prováveis para uma dispersão desta espécie da bacia do Sapucaí para a bacia do Paraíba do Sul seriam nos municípios de Campos do Jordão e Santo Antônio do Pinhal, onde as cabeceiras das drenagens Sapucaí e Sapucaí-Mirim localizam-se extremamente próximas das cabeceiras da drenagem Piracuama, que por sua vez estão muito próximas das cabeceiras da porção noroeste da drenagem do ribeirão Grande, sendo justamente nestas regiões que os exemplares de *Astyanax* sp.1 foram coletados na bacia do

Paraíba do Sul (Ingenito, 2004).

Embora o Córrego Perdizes (PE) também tenha sido amostrado por Ingenito (2004) a descrição de *Astyanax* sp.1 foi feita através da comparação com 15 exemplares coletados no Córrego Perdizes (PE) por F.A.G. Melo, depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ 22209). No mesmo trabalho, o Ribeirão Pequeno também foi amostrado.

De acordo com Hiruma et al. (2001) diversos eventos de capturas de cabeceiras ou de drenagens ocorreram recentemente na região do planalto de Campos do Jordão. Modenesi-Gauttieri et al. (2002) identificaram capturas de drenagem nas cabeceiras do Ribeirão do Sino e do Córrego Lavrinhas, também encontraram indícios de captura em diversas outras drenagens no planalto de Campos do Jordão. O Ribeirão do Sino (local não amostrado nesse trabalho), tem suas cabeceiras muito próximas do Ribeirão Grande, separadas por divisores pouco nítidos ao longo de falhas transcorrentes; e o Córrego Lavrinhas, por sua vez, tem cabeceiras separadas por apenas oito metros do Ribeirão Pirutinga (MODENESI-GAUTTIERI et al. 2002). Como os últimos eventos neotectônicos dessa região são datados no quaternário recente (cerca e 10.000 anos atrás, HIRUMA et al. 2001), é possível que contribuíram para o cenário genético encontrado entre as populações de *A. aff. scabripinnis*.

Desta forma, as diversas análises dos dados genéticos, bem como os estudos da neotectônica do planalto de Campos do Jordão, corroboram a hipótese de recente separação entre PE e RG. Entre ambas as populações verifica-se o menor valor de F_{ST} , as análises do STRUCTURE e PCoA, bem como as análises filogenéticas com DNA mitocondrial agrupam essas populações de maneira muito próxima. Além disso, somente as duas populações apresentam evidência de recente *bottleneck*, efeito genético esperado quando ocorre subdivisão recente de uma população (SPENCER, NEIGEL e LEBERG, 2000).

Não pode ser descartada também a hipótese de introdução artificial accidental ou proposital, já que essa espécie é usada para a colonização de pequenos corpos d'água ou de lagos artificiais (INGENITO e BUCKUP, 2007). Outros eventos de introdução são comuns nessa região. *Hyphessobrycon anisitsi*, que tem sua região de ocorrência no sistema Paraná-Paraguai e na porção brasileira da bacia do Uruguai, foi capturado no Lago Itapeva, um lago artificial. Sua ocorrência a tão longe de sua região de origem é mais logicamente explicada por um evento de introdução (INGENITO e BUCKUP, 2007).

Quanto à população do Lago Capivari, outras hipóteses podem explicar a marcante diferença entre essa população e as demais, dentre elas a colonização deste ambiente por indivíduos de várias outras populações. O Lago Capivari situa-se no centro da cidade de Campos do Jordão e é utilizado para lazer e entretenimento. Neste tipo de ambiente, como

discutido anteriormente, é comum a introdução antrópica proposital. As análises filogenéticas, nas diversas metodologias, agruparam indivíduos de RP com LC e de LC com LV. Além disso, há uma grande proximidade geográfica deste lago com o Córrego das Pedras (cerca de 2,5 quilômetros) e, de forma semelhante, a menor diferença genética (F_{ST}) entre LC e outra população, é com CP. As análises morfológicas feitas por C.A.M. de Oliveira, especialista na taxonomia do grupo, mostraram que indivíduos dessa população apresentam características morfológicas extremamente variáveis (comunicação pessoal). Do ponto de vista das análises genéticas, se as populações fundadoras estivessem estruturadas, espera-se que ocorra efeito Wahlund e LC apresente heterozigosidade elevada, como ocorreu aqui (HARTL e CLARCK, 2010). Além disso, a população LC foi a única a apresentar valores negativos e significativos para o teste D de Tajima. Essa condição é indício de, entre outros fatores, expansão populacional (TAJIMA, 1989), o que seria esperado quando ocorre a introdução de indivíduos. O conjunto desses fatores, corrobora a hipótese de que LC vem sofrendo introduções ou de que foi formada por indivíduos de várias populações, as quais seria muito difícil de se determinar com exatidão, mas pode-se sugerir que LV, RP e CP estariam entre elas. O fato de LC apresentar um grande número de alelos privados, demonstra que outras populações, além das amostradas nesse trabalho, também podem ter contribuído para a sua formação.

Alguns dados de trabalhos de citogenética também demonstraram semelhanças entre as populações estudadas. Kavalco e Moreira-Filho (2003) realizaram uma revisão de dados citogenéticos em diversas populações de *A. scabripinnis*. Encontraram, para as populações do Córrego das Pedras, Córrego Perdizes, Ribeirão Grande e Córrego Lavrinhas sempre as mesmas fórmulas cariotípicas (6 metacêntricos, 22 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos, 12 acrocêntricos), número de cromossomos supranumerários variando de nenhuma a duas e número de regiões organizadoras de nucléolos variando de duas até nove. Contudo, diferentemente desse trabalho, foi possível identificar diferenças entre as populações do Ribeirão Grande (NÉO et al., 2000a; NÉO et al., 2000b; FERRO et al., 2001) e Perdizes (VICENTE et al. 1996) principalmente quanto ao número de regiões organizadoras do nucléolo e presença de cromossomos supranumerários. Já as populações Córrego Pedras e Córrego Perdizes apresentaram as mesmas constituições cromossômicas (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992; VICENTE et al. 1996), porém, pequenas diferenças entre ambas foram encontradas na frequência de regiões organizadoras do nucléolo (VICENTE et al., 1996). Castro et al., (2014) analisaram as populações do Córrego das Pedras e Ribeirão Grande e também encontraram grande semelhança na macroestrutura cariotípicas e, a exemplo de outros

trabalhos (FERRO et al., 2001; NÉO et al., 2000a; NÉO et al., 2000b), encontraram diferenças sutis nas regiões marcadas por FISH entre duas diferentes altitudes dentro do próprio Ribeirão Grande. A mesma estrutura foi encontrada por Barbosa et al. (2015), nas populações do Ribeirão Grande, porém a 1850 metros de altura e do Córrego Lavrinhas, com diferenças nas regiões marcadas com as sondas 5s e 18s.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando comparadas a outras populações de *Astyanax*, *A. aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira apresentam bons níveis de heterozigosidade e de diversidade alélica. Embora todas as populações tenham apresentado baixos tamanhos efetivos, somente duas delas apresentaram evidências de terem passado por gargalos populacionais. Todavia, os valores de fixação gênica demonstraram indícios de endogamia para diversas populações, o que desperta a atenção para seus *status* de conservação. Como discutido, a subdivisão populacional pode levar a endogamia, a perda de riqueza alélica e perda heterozigosidade. Os dados levantados aqui demonstram que as populações estudadas podem estar passando pelos efeitos da separação e a migração parece ser uma estratégia para mitigar os efeitos nocivos do isolamento.

Tanto os marcadores moleculares baseados em microssatélites, quanto os marcadores baseados em DNA mitocondrial, demonstraram-se eficazes no estudo das histórias evolutivas das populações de *A. aff. scabripinnis* da Serra da Mantiqueira. Embora tenha uma formação antiga e seja comprovadamente funcional como barreira biogeográfica, a estruturação das populações estudadas é bastante complexa e, para sua análise, outros fatores geográficos precisam ser levados em consideração, além da simples separação destas em duas bacias de drenagem. O planalto de Campos de Jordão apresenta tectonismo recente, com evidências de soerguimentos e capturas de drenagem bastante recente. Embora os dados de geomorfologia de todos os corpos d'água usados no estudo sejam ainda incompletos, pode-se inferir, a partir dos resultados aqui obtidos, que a separação dos seis pontos de coleta em duas bacias não ocorreu simultaneamente. É ainda possível que eventos de capturas de drenagem entre corpos d'água da mesma bacia tenham precedido capturas entre as duas bacias.

Tanto evidências moleculares quanto evidências biogeográficas, demonstram que a população do Ribeirão Pequeno deve ter sido a primeira a se separar e pode já ter passado por um período de resiliência, não apresentando hoje evidências de endogamia nem de gargalos populacionais.

Diversas análises demonstraram a origem comum e a separação relativamente recente das populações do Ribeirão Perdizes, Córrego das Pedras, Córrego Lavrinhas e Ribeirão Grande, hipótese reforçada pelos estudos que demonstram a atividade tectônica recente na região onde foram realizadas as coletas. A separação ainda mais recente entre Córrego Perdizes e Ribeirão Grande, permite inferir a presença de um evento recente captura de drenagem nessa

região.

A população do Lago Capivari, sendo a população geneticamente mais diferente das demais, parece ter sido fundada por indivíduos de diversas outras populações. A fundação de LC é um evento difícil de se determinar, contudo há indícios de que indivíduos de RP, LV e CP possam ter contribuído na sua fundação ou de que foram introduzidos posteriormente.

Uma questão importante a ser levantada é a colonização histórica da região. Segundo Ingenito e Buckup (2007), a colonização da região por *A. aff. scabripinnis*, se deu a partir da bacia do Rio Sapucaí. A última grande revisão do gênero, demonstrou que *A. aff. scabripinnis* (alguns exemplares da região foram usados, inclusive) está relacionada a espécies do Alto Paraná e São Francisco (ROSSINI et al., 2016). Estas observações corroboram a hipótese da colonização a partir da bacia do Alto Paraná. Assim, esse modelo explica melhor os resultados obtidos nesse trabalho, onde nota-se a separação mais antiga da população RP, provavelmente por vicariância ocasionada pelos movimentos tectônicos, seguida pela colonização mais recente das cabeceiras do Paraíba do Sul. Essa movimentação pode ter separado primeiramente as populações LV e CP e, ainda mais recentemente, as populações PE e RG. Entre essas quatro populações ainda há indícios de fluxo gênico, o que retarda sua diferenciação e contribui para conservação genética das populações, ao incrementar a variabilidade genética.

8 REFERÊNCIAS

ABILHOA, V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 997-1005, 2007.

ADAMSON, E. A. S.; HURWOOD, D. A.; MATHER, P. B. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. **Freshw Biol**, v. 57, p. 2211-2229. 2012.

ALLENDORF, F. W.; LEARY, R. F. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: Soulé, M. E. (ed). **Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1986. p. 57-76.

ALMEIDA, F. F. M.; CARNEIRO, C. D. R. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociencias**, v. 28, n. 2, p. 135-150, 1998.

ANDERSEN, L. W.; FOG, K.; DAMGAARD, C. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1545, p. 1293-1302, 2004.

ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845-1855, 2015.

ASHLEY, M. V.; DOW, B. D. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. In: Schierwater B., Streit B., Wagner G.P., DeSalle R. (eds.). **Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications**. Birkhäuser, Basel: Experientia Supplementum, vol 69, 1994. p. 185-201.

AVISE, J. C. Phylogeography: **The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C.; WALKER, D.; JOHNS, G. C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. **Proc Biol Sci**, v. 265, p. 1707-1712, 1998.

BARBOSA, P.; OLIVEIRA, L. A.; PUCCI, M. B.; SANTOS, M. H.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R. F.; ALMEIDA, M. C. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, p. 55-62, 2015.

BEERLI, P. MIGRATE Documentation Version 3.2.1, 2012. Tallahassee, Florida: Florida State University. Disponível em [http:// popgen.sc.fsu.edu/ Migrate/ Info.html](http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Info.html). Acesso em 8/09/2017,

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 4563-4568, 2001.

BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Mol Ecol**, v. 7, p. 499-517, 1998.

BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 53-60, 2006.

BERTACO, V. A.; DE LUCENA, C. A. S. 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**, v. 8, n. 1, p. 7-20, 2010.

BIZERRIL, C. R. S. F. A Ictiofauna da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Biodiversidade e Padrões Biogeográficos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 1, p. 67-81, 1998.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C-H.; XIE, D.; SUCHARD, MA.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 14. 2014.

BOYCE, T. M.; ZWICK, M. E.; AQUADROT, C. F. Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: Size, Structure and Heteroplasmy. **Genetics**, v. 123, p. 825-836, 1989.

BRADIC, M.; BEERLI, P.; GARCÍA-DE LEÓN, F. J.; ESQUIVEL-BOBADILLA, S.; BOROWSKY, R. L. Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 9, 2012.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco – CODEVASF, 1988.

BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 453-455. 1996.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M. A.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 1, p. 245-247, 2001.

CALCAGNOTTO, D.; SHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 135-153, 2005.

CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; POMPEU, S. A.; LEAL, C. G.; OLIVEIRA, C.; HANNER, R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, v. 2, p. 80-86. 2011.

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. 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**, v. 25, n. 1, p. 231-244, 2014.

CHAKRABORTY, R.; DE ANDRADE, M.; DAIGER, S. P.; BUDOWLE, B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. **Annals of Human Genetics**, v. 56, p. 45-47, 1992.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

CHAUHAN, T.; RAJIV, K. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 01, n. 04, p. 281–291, 2010.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1-29, 2006.

CORNELIO, D.; CASTRO, J. P.; SANTOS, M. H.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 3, p. 681-689, 2017.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014. 1996.

COULON, A.; FITZPATRICK, J. W.; BOWMAN, R. STITH, B. M.; MAKAREWICH, C. A.; STENZLER, L. M.; LOVETTE, I. J. Congruent population structure inferred from dispersal behaviour and intensive genetic surveys of the threatened Florida scrub-jay (*Aphelocoma caerulescens*). **Molecular Ecology**, v. 17, n. 7, p. 1685-1701. 2008.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.

DE BORBA, R. S.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, C.; PERDICES, A.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; ALVES, A. L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River

basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 1, p. 111-116, 2013.

DEROIN, J. P.; DEFFONTAINES, B. Morphostructural analysis for linking streamflow, lithology and structure: comparison with remote sensing data on the Cévennes (French Massif Central). **Z. Geomorph. N.F.**, v. 39, p. 97-116, 1995.

DO, C.; WAPLES, R. S.; PEEL, D.; MACBETH, G. M.; TILLET, B. J.; OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: reimplementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 1, p. 209-214, 2014.

DOMINGUES, M. D. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper Rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 1, p. 37-44, 2007.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; BOUCKAERT, R. Divergence dating tutorial with BEAST 2.0. 2012. Disponível em: <https://beast2.googlecode.com/files/DivergenceDatingTutorial.v2.0.e.pdf>. Acesso em 17/09/2018

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EIGENMANN, C. H. **Catalogue of fresh water fishes of tropical and South America. Reports of the Princeton University Expedition to Patagonia, 1896-1899**, v. 3, n. 4, p. 375-511, 1910.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, v. 23, n. 3, p. 209-310. 1921.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FAUSCH, K. D.; TORGERSEN, C. E.; BAXTER, C. V.; LI, H. W. Landscapes to riverscapes: bridging the gap between research and conservation of stream fishes a continuous view of the river is needed to understand how processes interacting among scales set the context for stream fishes and their habitat. **Bioscience**, v. 52, p. 483-498, 2002.

FAVA, L. Variação cariotípica de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) nas bacias costeiras do Brasil. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, 2008.

FERREIRA-NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 792-796, 2009.

FERREIRA, D. G.; SOUZA-SHIBATTA, L.; SHIBATTA, O. A.; SOFIA, S. H.; CARLSSON, J.; DIAS, J. H. P.; MAKRAKIS, S.; MAKRAKIS, M. C. Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 1, p. 209–231, 2017.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.

FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55-62, 2001.

FOULLEY, J. L.; OLLIVIER, L. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock**

Science, v. 101, n. 1-3, p. 150-158, 2006.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008. 280p.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Londres: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. 388 p.

FU, Y.; LI, W. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709. 1993.

FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annu Rev Ecol Evol Syst**, v. 34, p. 397-423, 2003.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. Neptune City, New Jersey: T. F. H. Publications, 1977. 672 p.

GOLDSTEIN, D. B.; BARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. An Evaluation of Genetic Distances for Use With Microsatellite Loci. **Genetics**, v. 139, p. 463-471, 1995.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 5, p. 335-342, 1997.

GONDIM, S. G.; RESENDE, L. V.; BRONDANI, R. P.; COLLEVATTI, R. G.; SILVA-JÚNIOR, N. J.; PEREIRA, R. R.; TELLES, M. P. Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 3, p. 1513-1517, 2010.

GRIFFITHS, R.; TAVARE, S. Simulating probability distributions in the coalescent. **Theoretical Population Biology**, v. 46, p. 131–159, 1994.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HAPONSKI, A. E.; STEPIEN, C. A. Phylogenetic and biogeographical relationships of the sander pikeperches (Percidae: Perciformes): Patterns across north america and eurasia. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 110, n. 1, p. 156-179. 2013.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª edição. Porto Alegre; Artmed, 2010. 660 p.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, n. 22, v. 2, p. 160-174. 1985.

HASHIMOTO, D. T.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical ichthyology**, v. 8, n. 4, p.861-866, 2010.

HASUI, Y.; PONÇANO, W. L. **Organização estrutural e evolução da Bacia de Taubaté**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOLOGIA, 30, Recife. Anais... Recife: SBG, 1978. n. 1, p. 26-381.

HASUI, Y; PONÇANO, W. L.; BISTRICHI, C. A.; STEIN, D. P.; GALVÃO, C. A. C. F.; GIMENEZ, A. F.; ALMEIDA, M. A.; PIRES NETO, A. G.; MELO, M. S.; SANTOS, M. C. S. R. **Geologia da Região Administrativa 3 (Vale do Paraíba) e parte da Região Administrativa 2 (Litoral) do Estado de São Paulo**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, (Publicação 1106),1978. 78 p.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI, P. M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, n. 4, p. 308–310, 2002.

HAUSDORF, B.; WILKENS, H.; STRECKER, U. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 60, n. 1, p. 89–97, 2011.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identification through DNA barcodes. **Proc RSoc Lond B.**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 291–301, 2010.

HIRUMA, S.; RICCOMINI, C.; MODENESI-GAUTTIERI, M. C. Neotectônica no planalto de Campos do Jordão, SP. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 31, n. 3, p. 375–384, 2001.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J. F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, 2007.

HURLBERT, S. H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v. 52, p. 577-586, 1971.

INGENITO, L. F. S. O sudoeste da Serra da Mantiqueira como barreira biogeográfica para peixes. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - zoologia). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

INGENITO, L. F. S.; BUCKUP, P. A. The Serra da Mantiqueira, south-eastern Brazil, as a biogeographical barrier for fishes. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 7, p. 1173–1182, 2007.

JAISUK, C.; SENANAN, W. Effects of landscape features on population genetic variation of a tropical stream fish, Stone lapping minnow, *Garra cambodgiensis*, in the upper Nan River drainage basin, northern Thailand. **PeerJ**, v. 6, p. 29, 2018.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 498-511, 2010.

JONSSON, B.; JONSSON, N. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. N. **Rev Fish Biol Fisheries**, v. 3, n. 348. 1993.

KALINOWSKI, S. T. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on

measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 187-189, 2005.

KANTEK, D. L. Z.; CIPRIANO, R. R.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguaçú River. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n.1, p. 239-242, 2008.

KAVALCO, K. F.; BRANDÃO, K. D. O.; PAZZA, R. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 483, p. 477-483, 2009.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 453–461, 2003.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. **The Nucleus**, v. 53, n. 1-2, p. 51-54, 2010.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. D. O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* - *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 108–119, 2011.

KAVALCO, K. F. Estudos Evolutivos no Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Tese. (Doutorado em Ciências, Biologia-Genética). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 197p., 2008.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120. 1980.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Processes and their applications**, v. 13, p. 235-248, 1982.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEUZZI, M. S. P.; DE ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 355–362, 2004.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res**, v. 27, p. 209-220, 1967

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

MARRETA, M. E. Evidências Moleculares dos Padrões Evolutivos e Filogeográficos de Populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com Base em Caracteres do DNA Mitocondrial. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, 2011.

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

MATSCHINER, M.; SALZBURGER, W. TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1982-1983, 2009.

MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: Implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 395–402, 2009.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A.

DE M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 208-214, 2008.

MEIRMANS, P. G. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 60, p. 2399-2402, 2006.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MELO NETO, João Cabral de. **Morte e vida severina e outros poemas**. Rio de Janeiro: Alfaguara, 2007.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family characidae (teleostei: Characiformes): From characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385-568, 2010.

MODENESI, M. C. **Significado dos depósitos correlativos quaternários em Campos do Jordão – São Paulo: implicações paleoclimáticas e paleoecológicas**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do meio ambiente. Coordenadoria da pesquisa de recursos naturais. Instituto geológico – Boletim nº 7. pp. 155. 1988.

MODENESI-GAUTTIERI, M. C.; HIRUMA, S. T. A expansão urbana no planalto de Campos do Jordão. Diagnóstico geomorfológico para fins de planejamento. **Revista do Instituto Geológico**, v. 25, n. 1/2, p. 1-28, 2004.

MODENESI-GAUTTIERI, M. C.; TAKASHI HIRUMA, S.; RICCOMINI, C. Morphotectonics of a high plateau on the Northwestern flank of the continental rift of Southeastern Brazil. **Geomorphology**, v. 43, n. 3-4, p. 257-271, 2002.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J. S.; GEORGES, M.; HETZEL, D. J. S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 654-660. 1991.

MOREIRA-FILHO O., BERTOLLO L. C. A. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). A species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331–357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2–4, p. 230–234, 2004.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F., MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235–244, 1983.

NEI, M. Estimation of Average Heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. T. C. **Fishes of the world**. 5ª edição. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707p.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 108, p. 211-215. 2000b.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141. 2000a.

NEWMAN, D.; PILSON, D. Increased probability of extinction due to decreased effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. **Evolution**, v. 51, p. 354-362, 1997.

O'BRIEN, S. J.; ROELKE, M. E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C. A.; MELTZER, D.; COLLY, L.; EVERMANN, J. F.; BUSH, M.; WILDT, D. E. A genetic basis for species vulnerability in the chee-tah. **Science**, v. 227, p. 1428-1434. 1985.

OLIVEIRA, C. Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* sensu Bertaco & Lucena (2006) (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). 340f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2017.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 11, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C., BENINE, R. C., ORTÍ, G., VARI, R. P.; CORRÊA-E-CASTRO, R. M. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

ORNELAS-GARCIA, C. P.; DOMINGUEZ-DOMINGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 340, p.1-17, 2008.

PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; JULIO JUNIOR, H. F.; DIAS, A. L. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the Lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 667–671, 2010.

PAIVA, S. R. Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do Rio Doce-MG. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; DE MELLO AFFONSO, P. R. A.; MIRANDA, V. S.; SILVA JÚNIOR, J. C.; OLIVEIRA, C. G.; GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 4, p. 621–630, 2008.

PANARAM, K.; BOROWSKY, R. Gene Flow and Genetic Variability in Cave and Surface Populations of the Mexican Tetra, *Astyanax mexicanus* (Teleostei: Characidae). **Copeia**, v.

2005, n. 2, p. 409–416, 2005.

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

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 843–851, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 71-79. 2011a.

PEREIRA, L. H. G.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Parana Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, n. 22, v. 1, p. 87-96. 2011b.

PERES M. D; RENESTO, E.; LAPENTA, A. S.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in fluvial and lacustrine environments in the Upper Paraná River floodplain (Paraná State, Brazil). **Biochem Genet.** v. 40, p. 209-223, 2002.

PERES, M. D.; VASCONCELOS, M. DOS S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 717-724, 2005.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PROTAS, M. E.; HERSEY, C.; KOCHANNEK, D.; ZHOU, Y.; WILKENS, H.; JEFFERY, W. R.; ZON, L. I.; BOROWSKY, R. TABIN, C. J. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p. 107-111, 2006.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 201-204. 2018.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity**, v. 86, p. 248-249. 1995.

REEVES, R. G.; BERMINGHAM, E. Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 88, p. 235-255, 2006.

REIS, R. R.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 729 p.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Journal of Brazilian Genetics**, v. 20, n. 3, 1997.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution: international journal of organic evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225. 1989.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. Mrbayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.

Systematic Biology, v. 61, p. 539-542, 2012.

ROSA, R.; RUBERT, M.; MALABARBA, L. R.; MARTINS-SANTOS, I. C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 601-605, 2009.

ROSSINI, B. C.; OLIVEIRA, C. A. M.; GONÇALVES DE MELO, F. A.; BERTACO, V. A.; ASTARLOA, J. M. D.; ROSSO, J. J. , FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1-20, 2016.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

SAADI, A. Ensaio sobre a morfotectônica de Minas Gerais: tensões intra-placa, descontinuidades crustais e morfogênese. Tese para cargo de Professor Titular. 285f. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Geociências, Belo Horizonte, 1991.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50-56, 1992.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

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

SOARES, P. V. As inter-relações de elementos do meio físico natural e modificado na definição de áreas potenciais de infiltração na porção paulista da bacia do Rio Paraíba do Sul. 2005. 169f. Tese. (Doutorado em Geociências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SOFIA, S. H.; SILVA, C. R. M.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRE, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v. 553, p. 245-254, 2006.

SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1517-1528, 2000.

STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 150-151, 2003.

STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 699–710, 2003.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V. H.; WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, n. 2, p. 469–481, 2004.

STRECKER, U.; HAUSDORF, B.; WILKENS, H. Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p. 62–70, 2012.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 133-138, 2005.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TEMPLETON, A. R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 381-397, 1998.

THOMAZ, A.T. Filogenia e Filogeografia do Gênero *Hollandichthys* Eigenmann 1909 (Teleostei: Characidae). Dissertação. (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biociências da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2010.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia,

MG, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 246-249, 2008.

TRANTAFYLLIDIS, A.; LEONARDOS, I.; BISTA, I.; TRIANTAFYLLIDIS, A.; LEONARDOS, I.; BISTA, I.; KYRIAZIS, I. D.; STOUMBOUDI, M. TH; KAPPAS, I.; AMAT, F.; ABATZOPOULOS, T. J. Phylogeography and genetic structure of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). **Marine Biology**, v. 152, n. 5, p. 1159–1167, 2007.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VERA, M.; SOURINEJAD, I.; BOUZA, C.; Vilas, R.; Pino-Querido, A.; Kalbassi, M. R.; Martínez, P. Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. **Hydrobiologia**, v. 664, n. 1, p. 51-67, 2010.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janairensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 67–72, 2008.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 173–179, 2008.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated to the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 74, p. 70-75, 1996.

WALLACE, A. R. **Viagens pelo Amazonas e Rio Negro**. Tradução: Orlando Torres. São Paulo, Rio de Janeiro, Recife, Porto Alegre: Companhia Editora Nacional, 1939. 666p.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.

WEITZMAN, S. H.; FINK, W. L. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiformes. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 150, n. 6, p. 339-395, 1983.

WESTEMEIER, R. L.; BROWN, J. D.; SIMPSON, S. A.; ESKER, T. L.; JANSEN, R. W., WALK, J. W.; KERSHNER, E. L.; BOUZAT, J. L.; PAIGE, K. N. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. **Science**, v. 282, 1695-1698, 1998.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

YUE, G. H; DAVID, L.; ORBAN. L. Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Genetica**, v. 129, n. 3, p. 329-331, 2007.

ZAGANINI, R. Análise da estrutura genética de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) na bacia do Alto Rio Paraná. 102f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas. Área de concentração: Zoologia). Instituto de Biociências e Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2013.

ZAGANINI, R. L.; HASHIMOTO, D. T.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C.; MENDONÇA, F.F.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics - Online Resources**, v. 91, p. 24-26, 2012.

ZANATA, A. M. Jupiaba, um novo gênero de Tetragonopterinae com osso pélvico em forma de espinho (Characidae, Characiformes). **Iheringia**, Série Zoologia, v. 83, p. 99-136. 1997.

ANEXO A - Licença permanente para coleta de material zoológico (Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2

ANEXO B - Aprovação do protocolo de pesquisa pela Sub-Comissão de Ética em Animais-UEPG

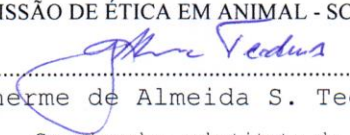


PARECER Nº 02/2008
Protocolo: 04509/08

Em reunião ordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Biodiversidade, Citogenética e Preservação dos Peixes dos Campos Gerais II"** de responsabilidade do Pesquisador Roberto Ferreira Artoni.

Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAL - SCEEA


.....
Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus
Coordenador substituto da SCEEA