

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) DA REGIÃO DE CAMPOS DO JORDÃO (SP)**

PRISCILA PINI ZENATTI

SÃO CARLOS – SP
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) DA REGIÃO DE CAMPOS DO JORDÃO (SP)**

PRISCILA PINI ZENATTI

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológica e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução. Área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Z54af

Zenatti, Priscila Pini.

Análise filogeográfica de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) da região de Campos do Jordão (SP) / Priscila Pini Zenatti. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética. 2. Filogeografia. 3. Citocromo b. 4. *Astyanax scabripinnis*. 5. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

Orientador
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

A sabedoria é muitas vezes mais útil
aos outros do que àquele que a
possui. *ECLESIASTES 09: 11*

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o
conforme as tuas forças, porque na
sepultura para onde tu vais, não há obra,
nem indústria, nem ciência, nem sabedoria
alguma. *ECLESIASTES 09: 10.*

O que foi, isso é o que há de ser, e o que
se fez, isso se tornará a fazer; de modo
que nada há novo debaixo do sol.
ECLESIASTES 01: 9.

Dedico este trabalho a minha mãe Laudicéia, ao meu pai Luiz Carlos e aos meus irmãos Sara e Dario: por todo amor, carinho e paciência que tiveram comigo, ajudando-me a alcançar o meu sonho e a construir o meu futuro. Eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aqui às pessoas e Instituições que, de alguma forma, foram importantes para a realização deste trabalho:

a Deus, pois tenho certeza que sem Ele eu não teria vencido mais esta etapa da minha vida. Agradeço pela saúde, pela paz, pela vida, pela família maravilhosa que Ele me deu e por todas as vezes de dificuldades e aflições que Ele me ajudou a vencer.

ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr., que tem me ajudado e orientado na execução deste trabalho; alguém que confiou em mim e deu-me a oportunidade de iniciar minha vida profissional;

ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pela sugestão do tema e por todas as conversas de grande importância para a realização deste trabalho;

ao Prof. Dr. Reinaldo A. de Brito, por ter auxiliado-me muitas vezes quando tive dúvidas ou dificuldades nas análises filogenéticas e por ter participado da minha banca de qualificação;

ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, por permitir o uso do seqüenciador automático;

ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Genética e Evolução;

à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro concedido;

ao Marcelo Vallinoto, pela imensa disposição em ajudar-me muitas e muitas vezes na aula e depois via e-mail, sempre muito atencioso e pronto a responder minhas inúmeras dúvidas;

à Dra. May Christine Modenesi, pela grande gentileza de enviar vários artigos sobre as Serra da Mantiqueira, além de um livro seu que foi muito útil;

à Regiane, Taty e Cláudio, pela amizade e por serem sempre prestativos nos mais variados problemas; ao Rodrigo, pelas ajudas com os computadores do laboratório;

aos técnicos Piau e Toninho pelas viagens de coletas e manutenção dos aquários;

ao Iderval (meu amigo "Idernélvisc"), por ser essa pessoa maravilhosa que é e por ter me ensinado muitas coisas como pesquisadora (por exemplo, como me organizar), pela grande amizade e companheirismo, por todas as ajudas na

realização deste trabalho (sem esquecer do dia que você ficou comigo fazendo reação de seqüenciamento até as 3 da manhã) e pelas boas risadas;

à Flavinha, minha amiga do coração, pelas longas e incansáveis horas de conversas, por todo apoio, carinho, amizade e por ser essa pessoa tão maravilhosa que é;

à Lelê, minha companheira de bancada desde que cheguei no laboratório; sempre pronta para ajudar, para ensinar e dona de grandes e valiosos conselhos. Minha companheira de finais de semana trabalhando no laboratório, ensinando-me nas mini-preps e também companheira de congressos. Quanta coisa eu aprendi com você!!

à Renatinha, uma amiga que eu gosto muito. Mesmo a gente conversando pouco admiro muito você, seu trabalho, seu empenho e sua alegria. Sempre nos contagia com seu bom humor. Obrigada por ajudar-me nas reações de seqüenciamento;

à Terumi, quem me acompanhou nos meus "primeiros passos" no laboratório desde a Iniciação Científica e sempre que precisei você me "socorreu";

ao Gustavo e à professora Dra. Silva Del Lama, por terem participado da minha banca de qualificação;

à Andréa Peripatto, por ter me ajudado várias vezes em muitas coisas e por ajudar-me com alguns materiais para a qualificação;

ao Marc, meu grande amigo, o famoso "Doido", mas para mim você não tem nada de doido. Obrigada por estar presente ao longo desta dura jornada do mestrado, sempre foi uma pessoa brilhante que na última hora aparecia fazendo "milagres", resolvendo mil e um problemas. Eu te admiro muito! Obrigada pelas imensas ajudas tanto no lab quanto nas análises;

à Ana Karina pelas infinitas vezes que me ajudou tanto nas técnicas do laboratório, como nas conversas de incentivo, nas discussões no início do meu trabalho e pela amizade tão valiosa;

à Michelle, que me ajudou muito nos géis de seqüenciamento;

à Carol Garcia, que esteve presente no meu primeiro ano de mestrado mas que nos trocou pela USP, deixando apenas a saudade e a lembrança da sua boa amizade. Sinto saudades;

ao Fefê, meu amigo "briguento", mas muito gente boa, por ter lido minha dissertação e pela amizade;

à Eli, grande companheira de coletas e por ter me suportado todos estes anos;

à Júlia, uma pessoa muito especial, às vezes doidinha e “barulhenta”, mas com uma bondade imensa. Muito obrigada por emprestar-me o seu computador;

ao Thiago (Ervilha) que queria um agradecimento especial só pra ele;

a todos os amigos e companheiros de rotina no laboratório, que de certa forma tiveram um papel especial na conclusão deste trabalho: Carol Dal Ri, Artur, Allysson, Vladimir, Felipe, Fernando (da Júlia), Maressa, Carla, Paty, Mercival, Thaís, Wellington, Karina, Maurício, Rodolfo, Karine, Rubens, Carol Lincoln, Celeste, Daniel (da Cito), Daniel Gaúcho, Marcelo Vicari, Rosângela (a dona), Débora, Fernando (Dr.), Nivaldo, Elô, Janete, Lídia, Andréia (Déia), Viviane (Vivi), César, Euclides, Marcelo, Dona Ritinha;

à minha prima Karen, por ajudar-me na extração dos tecidos dos peixes durante os finais de semana após a primeira coleta;

à minha tia Rose, meu tio Benê e meus primos Bryan e Caio, por todo amor, carinho e preocupação dispensados e por serem tão especiais e tão presentes em todos os momentos;

à minha tia Lu e ao tio Orlando, por muitas vezes emprestarem a máquina digital para eu fotografar meus peixes e por estarem sempre junto de nós, ajudando-nos quando precisamos e nos alegrando quando tudo está bem;

ao Fernando, meu companheiro, meu amigo, meu irmão, minha grande alegria e meu grande amor. Obrigada por todos os momentos que estive ao meu lado, incentivando-me e mostrando que ainda não era o fim e que eu poderia vencer. Obrigada por fazer parte da minha vida, aumentando em mim a certeza da realização dos meus sonhos!!!

à minha mãezinha querida, meu pai e meus irmãos, por serem a minha família, por me darem a oportunidade de estudar e o privilégio de chegar até aqui. Sei que muitas vezes foi difícil, quase impossível, mas vocês não desistiram e é por isso que eu nunca irei desistir: é por vocês, que eu amo muito. Minha família é a minha razão de viver!!!

a todos que o nome não está aqui citado, mas que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. A ESPÉCIE <i>Astyanax scabripinnis</i>	1
1.3. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PEIXES DE CABECEIRAS	5
1.4. O ESTUDO DE <i>A. scabripinnis</i> EM CAMPOS DO JORDÃO	6
1.5. O DNA MITOCONDRIAL E A FILOGEOGRAFIA	9
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS & MÉTODOS	18
3.1. MATERIAL	18
3.1.1. LOCAIS DE COLETA	18
3.1.1.1. BACIA DO RIO SAPUCAÍ-GUAÇU	20
3.1.1.2. BACIA DO RIO PARAÍBA DO SUL	22
3.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS	25
3.2. MÉTODO	26
3.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.2.2. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	27
3.2.3. AMPLIFICAÇÃO DO LOCO DO CITOCROMO b	28
3.2.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	31
3.2.5. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA	33
3.2.6. ANÁLISE DOS DADOS	35
3.2.6.1. Leitura e Alinhamento das Seqüências	35
3.2.6.2. Análise estatística descritiva	37
3.2.6.3. Análises filogeográfica e filogenética	38
3.2.6.4. Análise das variações cariotípicas versus variações moleculares	40
4. RESULTADOS	42
4.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA	42
4.2. ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS E SUAS DISTRIBUIÇÕES	43
4.3. ANÁLISES FILOGEOGRÁFICA E FILOGENÉTICA	45

5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8. ANEXOS	86

RESUMO

A espécie *Astyanax scabripinnis*, constituída por pequenos peixes, popularmente conhecidos como lambari, são habitantes das cabeceiras de pequenos córregos, formando isolados populacionais já bem conhecidos. Estas populações podem ser endogâmicas, apresentando baixo ou nenhum fluxo gênico e tamanho reduzido. Acredita-se que tais características tenham auxiliado na fixação de acentuada variabilidade cariotípica e morfológica, contribuindo para a elevada plasticidade fenotípica observada entre as diferentes populações. Devido a esses fatores, tem-se dado um tratamento especial para esse grupo de peixes, uma vez que eles representam um complexo de espécies. Porém, apesar dos estudos citogenéticos serem abundantes e de toda atenção voltada para este grupo, tal polimorfismo ainda não foi verificado em nível molecular, sendo sua filogenia ainda uma questão aberta. A partir da análise da variação genética intraespecífica de parte do gene mitocondrial citocromo b, foi possível verificar se as variações cariotípicas encontradas entre as populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão também existem em nível molecular, bem como estimar parte das relações filogenéticas atuais entre as mesmas. A análise da rede de haplótipos corrobora a hipótese de que estas populações estiveram em contato anteriormente ao soerguimento da Serra da Mantiqueira, e hoje se encontram geograficamente separada. Além disso, foi possível inferir que a população do Lago do Pedalinho, provavelmente esteja sofrendo influencia de ações antrópicas e/ou do efeito fundador. Estudos futuros utilizando um número maior de indivíduos por população permitirão a realização de análise cladística aninhada, e a utilização de marcadores moleculares com taxa evolutiva mais rápida, poderá inferir sobre uma história evolutiva mais recente deste grupo de peixes.

ABSTRACT

The lambaris, which include small *Astyanax scabripinnis* fish, inhabit the headwaters of small streams, forming well known populational isolates. These populations are possibly inbred, presenting little or no gene flow and reduced size. It is believed that these characteristics have aided the fixation of a pronounced karyotypic variability, contributing to the elevated phenotypic plasticity observed between the populations. Due to these factors, this fish group has received special treatment, since they represent a species complex. However, despite abundant cytogenetic studies and all the attention granted to this group, such a polymorphism has not yet been verified on a molecular level and its phylogeny remains unresolved. The verification of whether the karyotypic variations found between the *A. scabripinnis* populations of the Campos do Jordão region also exist on a molecular level, the estimate of part of the current phylogenetic relationships between them and, also, the verification of whether there is any relationship between the presence or absence of B chromosomes in this species with the observed haplotypic diversity was possible through the analysis of the intraspecific genetic variation of a part of the mitochondrial cytochrome *b*. The results corroborate the hypothesis that these populations were in contact prior to the elevation of the Serra da Mantiqueira and that they are currently geographically separated. The phylogenetic relationships between the studied populations are discussed. The absence of evolutionary relationship between the cytochrome *b* gene and the supernumerary chromosomes of these populations was observed.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os peixes representam um grupo de vertebrados bastante grande e diversificado. São cerca de 24.600 espécies o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies conhecidas de todos os demais vertebrados (NELSON, 1994). Segundo REIS (2003), existem cerca de 4.000 espécies descritas de peixes de água doce neotropicais, porém há estimativas de que possam existir cerca de 6.000. A Região Neotropical é extremamente diversificada e complexa e sua rede hidrográfica é portadora dos mais representativos grupos de espécies de peixes de água doce do mundo. Essa diversidade pode ser diretamente correlacionada com a heterogeneidade estrutural, bem como com a história geológica dessa região (LOWE-McCONNELL, 1999; NAKATANI *et al.*, 2001).

A ordem Characiformes é o grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, apresentando 10 famílias com cerca de 237 gêneros e pelo menos 1343 espécies (NELSON, 1994). Dentro desta ordem encontra-se a família Characidae, sendo considerada a mais especiosa e mais complexa do ponto de vista taxonômico quando comparada às outras famílias (FOWLER, 1948; GODOY, 1975; NELSON, 1994; BRITSKI *et al.*, 1999). Compreende cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros (BRITSKI *et al.*, 1988).

1.2. A ESPÉCIE *Astyanax scabripinnis*

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por BAIRD & GIRARD (1854) e a primeira revisão mais completa desse grupo, realizada por EIGENMANN entre 1921 a 1927, validou 74 espécies e subespécies. Posteriormente, GÉRY (1977) enumerou

uma lista de 62 espécies e subespécies em águas doce do Brasil. A revisão mais recente, realizada por LIMA *et al.*, (2003), cita 86 espécies, elevando as poucas subespécies existentes a espécies.

Anteriormente, o gênero *Astyanax* estava alocado na subfamília Tetragonopterinae, porém hoje é considerado um gênero *Incertae Sedis* pertencente à família Characidae (LIMA, *et al.*, 2003). Destaca-se por apresentar o maior número de espécies da família (FOWLER, 1948; GODOY, 1975; BRITSKI *et al.*, 1999; BUCKUP, 1999), possuindo parte da sua sistemática mal definida e representando um aglomerado polifilético (MENEZES, 1992; BRITSKI *et al.*, 1999; BUCKUP, 1999). Está representada nos rios do Estado de São Paulo por 9 gêneros e um total de 26 espécies, compreendendo peixes de pequeno porte, que geralmente não ultrapassam 10 centímetros de comprimento (BRITSKI, 1972). A maioria das espécies pertencentes a esse grupo é omnívora, apresenta hábitos de forrageamento muito ativos (BRITSKI *et al.*, 1988) e pode ser encontrado desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (BRITSKI, 1972) sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977).

Os peixes deste gênero são conhecidos popularmente como lambaris ou piabas e apresentam como características morfológicas linha lateral completa, escamas de tamanho normal cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal, nadadeira adiposa geralmente presente, pré-maxilar não protrátil, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, sendo a interna com cinco dentes, dentes com cúspides e a altura do corpo cerca de 3 vezes menor que o comprimento padrão (BRITSKI *et al.*, 1988).

A. scabripinnis é uma espécie representada por peixes de pequeno porte, que habitam riachos rasos com menos de um metro de largura, de baixa correnteza e leito areno-pedregoso, ocupando a coluna d'água abaixo da vegetação marginal (CARAMASHI, 1986). É constituída por pequenas populações isoladas e endogâmicas que, devido às suas características biológicas, vivem confinadas às cabeceiras destes pequenos tributários (GOMES & AZEVEDO, 1960; BRITSKI, 1972). Tal isolamento permite que possíveis mudanças genótípicas e fenotípicas sejam fixadas dentro de cada população produzindo, portanto, um elevado polimorfismo ou plasticidade fenotípica entre as populações (CARAMASCHI, 1986).

De acordo com alguns dados do trabalho de FINK & FINK (1981), bem como de LIMA *et al.* (2003), *A. scabripinnis* está situado na seguinte posição taxonômica:

CLASSE – Osteichthyes

SUBCLASSE – Actinopterygii

INFRACLASSE – Neopterygii

DIVISÃO – Teleostei

SUBDIVISÃO – Euteleostei

SUPERORDEM – Ostaryophysi

SÉRIE – Otophysi

SUBSÉRIE – Characiphysi

ORDEM – Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

GÊNERO – *Incertae Sedis*

MOREIRA-FILHO & BERTOLLO (1991) observaram uma diversidade cariotípica acentuada em sete populações pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Paranapanema, São Francisco e Tietê. Resultados cariotípicos combinados com análises morfológicas de seis dessas populações permitiram diferenciá-las em seis formas distintas, sugerindo serem representativas de diferentes espécies. *A. scabripinnis* passou, então, a ser considerada um complexo de espécies: o "Complexo *scabripinnis*".

MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS (1998) estudaram quatro populações do complexo *scabripinnis* em três bacias hidrográficas diferentes e também encontraram diferenças cariotípicas e morfológicas em todas as populações.

Muitos trabalhos têm mostrado que este complexo apresenta grande diversidade de formas cariotípicas e número diplóide ($2n = 46$ a 50) (MORELLI *et al.*, 1983; MARTINS *et al.*, 1984; MOREIRA-FILHO, 1989; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA *et al.*, 1995; MAISTRO *et al.*, 1998; FERRO, 2000), variabilidade do número e posicionamento das Regiões organizadoras de nucléolo (RONS) e das heterocromatinas constitutivas (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA & MOREIRA-FILHO, 1995; MAISTRO *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2001), bem como a ocorrência de cromossomos B com diferentes morfologias, frequências, tamanho e número, particularmente na região de Campos do Jordão (VICENTE & GALETTI JUNIOR, 1994; VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a/b; FERRO *et al.*, 2001;).

Além da diversidade cariotípica e fenotípica, *A. scabripinnis* também apresenta polimorfismos enzimáticos (MUNIN *et al.*, 2004). Dessa forma, acredita-se que este grupo de peixes possua, paralelamente ao dinamismo do cariótipo, um genoma mais

susceptível a variações, com conseqüente taxa elevada de mutação do material genético (MANTOVANI *et al.*, 2000).

Tais peculiaridades atuam no sentido de elevar o grau de variabilidade genética nas populações de *A. scabripinnis*, contornando os possíveis efeitos prejudiciais causados pelos sucessivos endocruzamentos em grupos pequenos e isolados. Este fator teria um papel primitivo no surgimento da diversidade cariotípica, dos polimorfismos enzimáticos e da plasticidade fenotípica (CARAMASHI, 1986; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991), permitindo a ocupação das cabeceiras dos riachos por essa espécie, onde há acentuada variação dos fatores abióticos, e a adaptabilidade a ambientes diferenciados, quando considerada cada microbacia separadamente (MANTOVANI *et al.*, 2000).

1.3. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PEIXES DE CABECEIRAS

Nos últimos anos, o número de publicações sobre a citogenética e genética-bioquímica de peixes tem aumentado consideravelmente, mas referem-se, principalmente, a espécies que habitam calhas de rios ou ambientes lênticos. Trabalhos relativos a ambientes de cabeceiras são raros e, geralmente, restritos a levantamentos faunísticos, abordagens taxonômicas ou distribuição longitudinal de espécies (CARAMASCHI, 1986; GARUTTI, 1988; LANGEANI-NETO, 1989). Estudos evolutivos de peixes, particularmente os de cabeceira, são escassos tanto nas áreas de citogenética, genética-bioquímica, como da genética molecular.

LOWE-McCONNEL (1969) reforça a importância de se estudar ambientes de cabeceira, enfatizando que o tamanho absoluto dos sistemas de rios de grande porte é um importante fator no processo evolutivo dos peixes, uma vez que muitas

espécies podem ser isoladas geograficamente nas cabeceiras de seus tributários através de barreiras físicas, químicas ou bióticas. Bacias de drenagem de água doce, por definição, são espacialmente desconectadas e, portanto, espera-se que as populações de peixes que as habitam sejam geneticamente estruturadas. No entanto, leitos e cursos dos rios podem ser alterados por movimentos tectônicos e, drenagens adjacentes podem ser conectadas várias vezes através de captura de cabeceiras ou por fusão de saídas, e outras drenagens podem permanecer isoladas. KING (1956) relata que antigas cabeceiras do rio Tietê foram anexadas pelo Paraíba do Sul, constituindo um exemplo de captura fluvial, o que pode constituir um mecanismo capaz de permitir uma redistribuição do material biótico. MODENESI (1988) também relata a ocorrência de fenômenos de inversão de drenagem no Ribeirão Galvão, no Planalto de Campos do Jordão sugerindo a ocorrência de uma tectônica recente. Tais alterações nas condições ecológicas permitem um isolamento microgeográfico, com várias espécies de peixes ficando limitadas a diferentes trechos de um mesmo rio.

1.4. O ESTUDO DE *A. scabripinnis* EM CAMPOS DO JORDÃO

A região de Campos do Jordão (figura 1.1) é marcada por um divisor de águas, a Serra da Mantiqueira, com altitudes variando de 600 a 2050 metros, que separa as bacias dos rios Paraná e Paraíba do Sul. Com extensão aproximada de 45 km e largura máxima de 18 km o setor da Mantiqueira é delimitado e definido como Planalto de Campos do Jordão (MODENESI, 1988). Por ser um local de relevo bastante acidentado atrai muito a atenção dos estudos em *A. scabripinnis*.



FIGURA 1.1. Vista panorâmica da região de Campos do Jordão

Para uma melhor compreensão da relação atual desta região com a espécie *A. scabripinnis* segue abaixo uma breve explicação das condições passadas da Serra da Mantiqueira e desse grupo de peixe.

Nas fases mais frias dos períodos glaciais quaternários, o Planalto de Campos do Jordão esteve sob temperaturas sensivelmente mais frias que as atuais, ou seja, um resfriamento de 4º a 6 °C. O soerguimento do Planalto, iniciado no Oligoceno (entre 23 a 34 milhões de anos atrás) e acentuado no Plioceno (entre 5 a 2 milhões de anos atrás) não deve ter sido contínuo. Um soerguimento inicial responderia pela compartimentalização regional, pela formação da Fossa do Paraíba, do *Horst* da Serra do Mar e do *Semi-Horst* da Serra da Mantiqueira. As fases mais recentes teriam acentuado as diferenças de altitudes, caracterizando o sistema de montanha tropical. No entanto, evidências morfológicas e fenômenos da inversão da drenagem sugerem a interferência de levantamentos muito recentes na morfogênese do

Planalto, ou seja, ocorrência de novos soerguimentos durante o Pleistoceno Superior (11 a 2 milhões de anos atrás) (MODENESI, 1988).

Uma consequência importante do soerguimento do Planalto e da deformação da superfície dos campos foi a incisão profunda dos cursos d'água e o ajustamento das drenagens às estruturas (MARTONE, 1940 & RUELLAN, 1952).

Acredita-se que as espécies de peixes atualmente presentes na região de Campos do Jordão viviam em simpatria anteriormente ao soerguimento da Serra da Mantiqueira (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991). TRAVASSOS (1955) encontrou fósseis de animais, pertencentes à subfamília Tetragonopterinae, Vale do Paraíba, em folhelhos que indicavam idade Pleistocênica (2 a 11 milhões de anos atrás), indicando que esses grupos de peixes têm ocupação antiga nesta região. Com o soerguimento da Serra da Mantiqueira, as populações das diversas espécies de peixes, que habitavam a região, poderiam ter sido redistribuídas ou fragmentadas em populações menores, originando uma situação de alopatria.

Devido às elevadas altitudes da Serra da Mantiqueira, a temperatura dos sistemas hídricos é relativamente baixa e existe uma grande quantidade de riachos formando cachoeiras que impedem o fluxo permanente entre as populações de peixes ali presentes. Alguns desses riachos formam a cabeceira do rio Sapucaí-Guaçu, pertencente à bacia do rio Paraná. Outros são afluentes do rio Paraíba do Sul, pertencente às bacias do Leste.

Cada população isolada nos trechos de pequenos tributários possui uma história evolutiva independente, possibilitando o surgimento de variantes interpopulacionais (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991). Assim sendo, diferentes populações de *A. scabripinnis*, podem ser encontradas nessa região, proporcionando

um excelente material de estudo de natureza genético-evolutiva. Segundo CARAMASCHI (1986), a tolerância mostrada por *A. scabripinnis* à variação dos fatores abióticos (temperatura da água, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e turbidez) pode ser um fator preponderante no processo de ocupação do ambientes de cabeceiras por essa espécie, bem como sua presença em pequenos rios.

1.5. O DNA MITOCONDRIAL E A FILOGEOGRAFIA

A mitocôndria é uma organela encontrada na maioria dos organismos eucariontes e está envolvida com a degradação de gorduras e açúcares na célula, importantes para a respiração celular. O genoma mitocondrial dos vertebrados é uma molécula de DNA circular, pequena, de dupla fita, haplóide, aparentemente não sofre recombinação e parece ter herança materna, quase que exclusivamente. A mitocôndria paterna parece ser ativamente degradada durante a fertilização (MELAND *et al.*, 1991). Dessa forma, a herança clonal e maternal são as características mais importantes do genoma mitocondrial, pois a sua evolução corresponde exatamente ao modelo de bifurcação das árvores evolutivas, ou seja, admitindo-se que não ocorre recombinação entre as moléculas de DNAm, o número de diferenças entre as seqüências de dois indivíduos é proporcional ao tempo transcorrido desde o momento em que compartilharam seu último ancestral comum (WALLACE, 1995).

O DNA mitocondrial (DNAm) animal tem um tamanho aproximado de 16 kb (kilobases) (CLARK-WALKER, 1985), no entanto, já foi constatado um genoma mitocondrial animal de 39.3 Kb em moluscos (SNYDER *et al.*, 1987). Em peixes, variações intraespecíficas no tamanho podem ser tão freqüentes quanto entre

espécies (BERMINGHAM, LAMB & AVISE, 1986). MOYSÉS & ALMEIDA-TOLEDO (2002) estimaram o tamanho do genoma mitocondrial em *Astyanax scabripinnis paranae* em 16.5 Kb.

O código genético mitocondrial é mais degenerado e, portanto apresenta uma taxa de diversificação maior e evolui mais rapidamente do que o código genético nuclear universal de eucariotos. Porém, ao contrário do genoma nuclear, é altamente eficiente (ATTARDI, 1985; CANTATORE & SACCONI, 1987; GRAY, 1989) e considerado uma molécula econômica, pois raramente contém seqüências duplicadas e não-codificante. Os genes que codificam as proteínas mitocondriais não contêm íntrons e são geralmente separados por menos de 10 pb. Dois genes podem se aproximar sem espaçadores entre eles e, em alguns casos, podem até se sobrepor por várias bases. Pseudogenes, elementos transponíveis e seqüências repetitivas são raras ou mesmo ausentes (MEYER, 1994; ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001).

A organização gênica do genoma mitocondrial dos vertebrados parece ser extremamente conservada em grupos taxonômicos distintos, como em mamíferos placentários, peixes ósseos e cartilagosos, anfíbios, entre outros. Por outro lado, aves, alguns répteis e marsupiais apresentam variação quanto ao número de genes e na organização do DNAm (NAHUM, 2004; MEYER, 1994). Quanto à organização, a grande diversidade encontrada no DNAm dos organismos pode ser atribuída principalmente às histórias evolutivas das várias linhagens (SACCONI *et al.*, 1999; BOORE, 1999).

Em geral, o DNAm dos peixes contém 37 genes, sendo 22 codificantes para RNAs transportadores, 2 para RNAs ribossomal, e 13 codificantes de polipeptídeos, sendo 3 da citocromo oxidase COI-III, 7 da NADH desidrogenase, 2 de síntese de

ATP, e o complexo do citocromo b. Uma região maior e não codificante, altamente variável dentro do DNAm_t é uma região denominada "região controle" ou "alça D-loop" (Displacement Loop), que contém o sítio de iniciação para a replicação do DNAm_t e para a transcrição do RNA nos vertebrados (MEYER, 1994). Os genes mitocondriais representam, aproximadamente, 5% da maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (MORITZ *et al.*, 1987). A figura 1.2 ilustra uma molécula de DNAm_t de vertebrados em sua estrutura circular.

Vários estudos indicam que o DNAm_t possui uma taxa de evolução 5 a 10 vezes mais rápida do que genes nucleares de cópia única (PERLER *et al.*, 1980; GARCIA-MACHADO *et al.*, 1996), provavelmente, devido à falta de histonas e mecanismos de reparo para uma maior frequência de mutações (GARESSE *et al.*, 2001). Há três maneiras mutacionais pelas quais o DNA pode ser alterado: substituições (sinônimas e não sinônimas), indels (inserção ou deleção) e rearranjos. Destas, as substituições sinônimas são mais frequentes do que indels, e os rearranjos são as formas menos comuns de mudanças no DNA. Inserção e deleção são mais frequentemente observadas na região controle e espaçadores intergênicos.

A regularidade que cada gene codificador de proteína possui em acumular mutações torna-o grande candidato para estudos filogenéticos em peixes. Mutações na terceira posição dos códons (e raramente na primeira) que não resultam em alteração do aminoácido (substituições silenciosas ou sinônimas), acumulam-se muito mais rapidamente do que substituições não sinônimas (aquelas que resultam na alteração do aminoácido). Transversões (mudança de uma purina por uma pirimidina e vice-versa) são mais raras e têm uma maior chance de serem indicadores confiáveis de descendência.

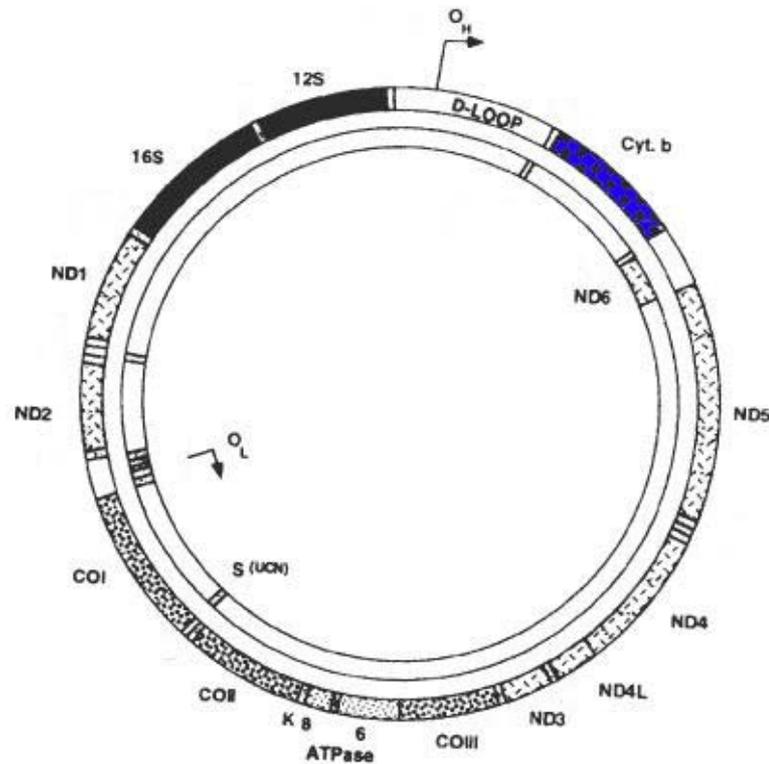


FIGURA 1.2: Estrutura e organização dos genes em uma molécula de DNA mitocondrial. OH (origin heavy) e OL (origin light) indicam as origens de replicação das cadeias pesada e leve respectivamente. Cada gene está representado pela sigla de seu nome. O citocromo b está em azul, logo após a região controladora – D-Loop.

Apesar da rápida taxa de evolução do DNAm, alguns genes podem ser mais conservados, como por exemplo, o citocromo b, e isso permite uma grande plasticidade em relação às aplicações deste genoma em inferências filogenéticas, pois permite resolver divergências que ocorreram há 100 milhões de anos até variabilidade interpopulacionais. Muitos trabalhos têm utilizado o DNAm para questões filogenéticas e filogeográficas. PRIOLI *et al.* (2002), utilizando marcadores moleculares RAPD e seqüências do DNAm, verificaram que a população de *A. bimaculatus* do Rio Iguaçu não era endêmica da região, e sim que havia sido introduzida recentemente, pois apresentou alta similaridade do DNAm com duas

outras populações de *A. altiparanae* pertencentes à bacia do Paraná, sendo estas últimas geograficamente isoladas da primeira.

Populações de caverna e de superfície de *A. fasciatus*, no México, têm sido intensamente estudadas a fim de se compreender as relações filogenéticas entre elas. Análises com alozimas apontaram para um único evento fundador para as populações de caverna (AVISE & SELANDER, 1972). Por outro lado, DOWLING *et al.* (2002) propuseram, baseados em seqüências do gene ND2 do DNAm, pelo menos dois eventos fundadores para esse grupo de caverna. STRECKER, BERNATCHEZ & WILKENS (2003) repetiram as análises, utilizando como marcadores moleculares locos microssatélites e seqüências do gene citocromo b do DNAm, e sugeriram origens múltiplas para este mesmo grupo de peixes.

Muitos estudos utilizando DNAm têm sido realizados em peixes de água doce (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; PERDICER *et al.*, 2002; MATEOS *et al.*, 2002; FARIAS *et al.*, 1999; FARIAS *et al.*, 2001; BRIOLAY *et al.*, 1998; STRECKER, FAÚNDEZ & WILKENS 2004; CALCAGNOTTO *et al.*, 2005; DOADRIO *et al.*, 2002; ORTI & MEYER, 1997). No entanto, em alguns casos as árvores filogenéticas mostram-se não resolvidas ou com baixo suporte. Isso acontece devido aos estudos serem realizados dentro de um único corpo d'água ou com uma população relativamente pequena de uma espécie como um todo (AVISE *et al.*, 1988).

A utilidade do DNAm como marcador molecular para estudos filogeográficos foi descoberta na década de 70 com o trabalho pioneiro de AVISE *et al.* (1979), em camundongos. Em 1979, BROWN e colaboradores, descobriram o elevado ritmo de evolução das seqüências do DNA mitocondrial – aproximadamente 2% de divergência de seqüência entre pares de linhagens por milhão de anos. Tal

descoberta foi surpreendente, pois parecia violar um princípio fundamental da evolução molecular, em que a pressão de seleção sobre um gene funcional implica na limitação da evolução da estrutura macromolecular. Anteriormente a 1979, acreditava-se que o pequeno tamanho e a economia genética da molécula, tornavam-na a seqüência nucleotídica da célula com a menor taxa evolutiva (AVISE, 2000). Várias hipóteses foram propostas para explicar a rápida evolução do DNA mitocondrial:

1. Relaxamento da constrição funcional, pois o DNA mitocondrial não codifica proteínas que estão envolvidas diretamente na sua própria replicação ou transcrição e também, uma molécula que codifica aproximadamente 13 tipos de polipeptídeos pode tolerar uma menor acuracidade na tradução;
2. Elevada taxa de mutação, devido à ineficiência de mecanismos de reparo do DNA, alta exposição a radicais livres no ambiente mitocondrial oxidativo e também a elevada replicação dentro de linhagens celulares;
3. O fato do DNA mitocondrial ser “desprotegido”, ou seja, não está complexado com proteínas histonas, as quais são evolutivamente conservadas e podem atuar como constrição na taxa evolutiva do DNA nuclear.

Estas possibilidades não são mutuamente exclusivas. Independentemente da causa, a rápida evolução de seqüências é um pré-requisito para a utilidade do DNA mitocondrial como um marcador filogenético microevolutivo.

A filogeografia é um campo de estudo relacionado com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica entre espécies próximas (AVISE *et al.*, 1987). Como o próprio nome diz, filogeografia considera o espaço e o tempo para mapear a genealogia de genes de interesse, ou seja, a distribuição espacial dos alelos cujas relações filogenéticas são conhecidas ou podem ser estimadas (AVISE, 2000). Além disso, análises filogeográficas apropriadas podem fornecer dados importantes com relação aos processos evolutivos que determinam os padrões contemporâneos de diversificação e separação histórica de linhagens gênicas, mesmo que estas tenham comportamento estritamente neutro. Populações historicamente isoladas são as principais candidatas a diferenças na adaptação genética, pois elas teriam tido uma exposição potencialmente longa a pressões de seleção divergentes sem a influência homogeneizadora do fluxo gênico (AVISE, 2000).

O DNAm_t tem sido fonte de dados para inferências genealógicas no nível intraespecífico, pois oferece vantagens para análises filogeográficas no nível micro-evolutivo. No entanto a espécie *A. scabripinnis* de Campos do Jordão, ainda não tinha sido estudada quanto à sua filogeografia até o momento, e este trabalho é pioneiro em analisar a diversidade haplotípica contemporânea e relacioná-la com a distribuição geográfica destas populações, utilizando como ferramenta molecular o gene citocromo b do DNAm_t.

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Muitos estudos citogenéticos, realizados com as populações de *Astyanax scabripinnis* têm mostrado grande plasticidade fenotípica e variabilidade cariotípica em populações pertencentes a uma mesma bacia hidrográfica, como diversidade de formas cariotípicas, variabilidade no número diplóide (46, 48 e 50), ocorrência de cromossomos supranumerários com diferentes morfologia, frequência, tamanho e número, variabilidade do número e posicionamento das RONS e das heterocromatinas constitutivas. Na região de Campos do Jordão, apesar do número de cromossomos $2n = 50$ manter-se constante em todas as populações já analisadas, polimorfismos relacionados com a presença de cromossomos supranumerários foram largamente descritos. As populações de *A. scabripinnis* localizadas nas altitudes maiores da região de Campos do Jordão apresentam uma grande incidência de cromossomo B, ou seja, uma grande quantidade de heterocromatina, e isso confere a estas populações um grau de polimorfismo maior quando comparadas a outras que não apresentam tal cromossomo.

Devido a esses fatores, tem-se dado um tratamento especial para esse grupo de peixes, uma vez que eles representam um complexo de espécies. Porém, apesar dos estudos citogenéticos serem abundantes e de toda atenção voltada para este grupo, tal polimorfismo ainda não foi verificado em nível molecular, sendo sua filogenia ainda uma questão aberta e pouco se sabe a respeito da variabilidade genética dessas populações naturais de peixes que vivem confinadas às regiões de cabeceiras dos rios.

Portanto, considerando a variabilidade cromossômica apresentada por *A. scabripinnis* de Campos do Jordão e a carência de dados moleculares, populações desta espécie da mesma localidade, reconhecidamente polimórficas quanto aos padrões cromossômicos, foram analisadas no presente trabalho a fim de:

- ♣ Verificar se as variações e cromossômicas encontradas nesta espécie também existem em nível molecular, utilizando como marcador molecular seqüências de parte do gene citocromo b do DNA mitocondrial;
- ♣ Investigar as relações filogenéticas atuais entre essas populações.
- ♣ Verificar se há alguma relação entre a presença ou ausência do cromossomo B nesta espécie com a diversidade haplotípica encontrada por DNA mitocondrial.

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. LOCAIS DE COLETA

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* (figura 3.1) utilizados no presente trabalho, foram coletados na região de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, em riachos com altitudes variando entre 600 e 1.920 metros. As coletas foram realizadas em oito localidades, sendo quatro pertencentes à Bacia do Rio Sapucaí-Guaçu e quatro pertencentes à Bacia do Rio Paraíba do Sul (figura 3.2). A seguir será apresentada breve descrição de cada ponto de coleta.



FIGURA 3.1: Exemplos representativos de *Astyanax scabripinnis* coletados na região de Campos do Jordão – SP. (A) exemplar fêmea; (B) exemplar macho.

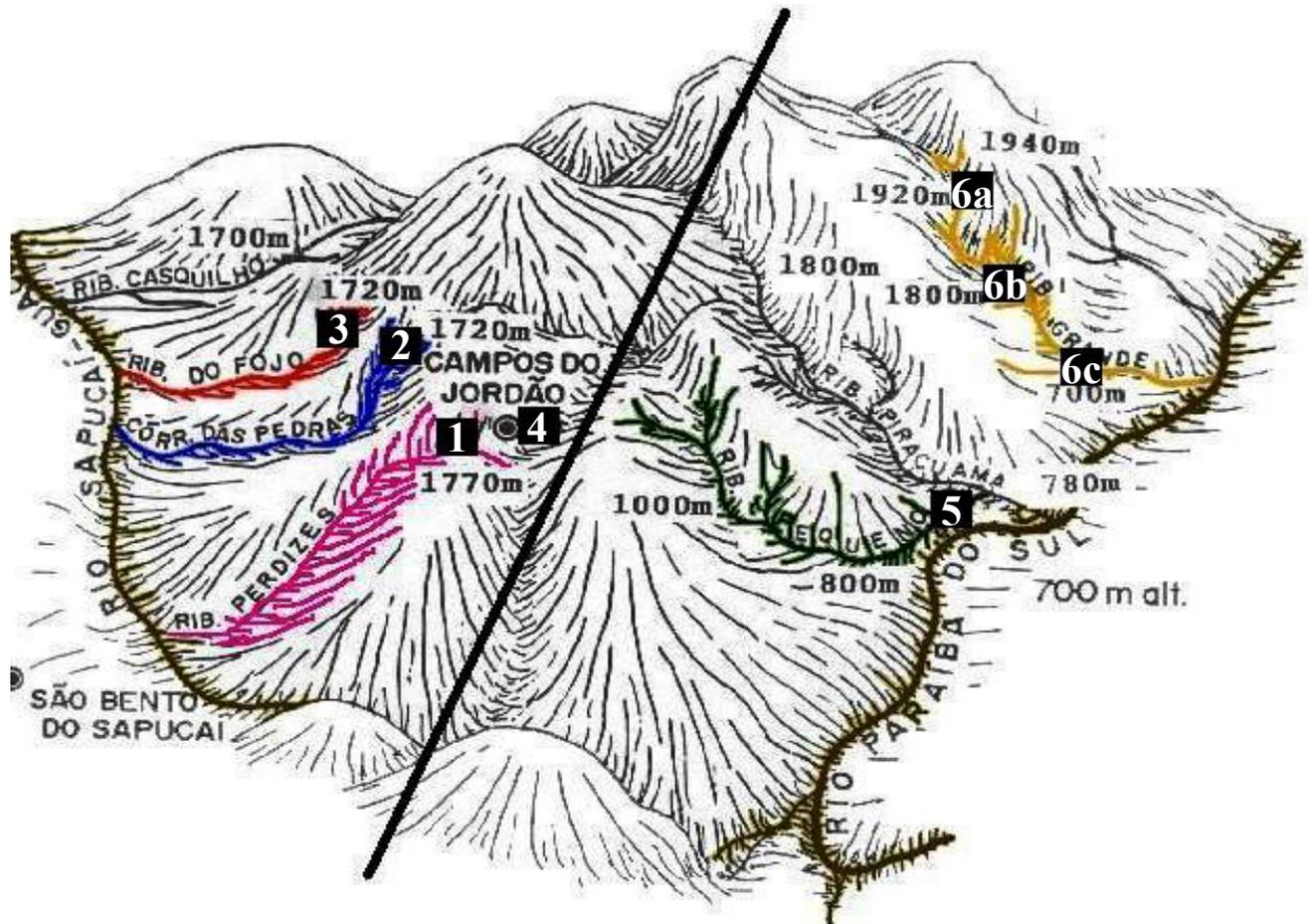


FIGURA 3.2: Localização da região de Campos do Jordão (SP) junto ao divisor de águas – Serra da Mantiqueira – das bacias dos Rios Grande e Paraíba do Sul. A ampliação da área revela os oito (8) pontos de coletas e suas respectivas altitudes. (1) Ribeirão das Perdizes (1.770m); (2) Córrego da Pedras (1720m); (3) Ribeirão do Fojo (1720m); (4) Lago do Pedalinho em Capivari (1.640m) (5) Ribeirão Pequeno (700m); (6A) Ribeirão Grande – São José dos Alpes (1920m); (6B) Ribeirão Grande – Represa Santa Isabel (1800m); (6C) Ribeirão Grande – à jusante da Represa Santa Isabel (700m). A linha transversal evidencia a Serra da Mantiqueira.

3.1.1.1. BACIA DO RIO SAPUCAÍ-GUAÇU

a) RIBEIRÃO DAS PERDIZES (população 01) – tem sua nascente a 1.800 metros de altitude no município de Campos do Jordão (SP) e corre em direção ao Norte, desembocando à margem direita do Ribeirão Capivari. A partir desta confluência, este último ribeirão passa a ser denominado Rio Sapucí-Guaçu. O local de coleta localiza-se na Vila Inglesa, na cidade de Campos do Jordão, a 1.770 metros de altitude.

b) CÓRREGO DAS PEDRAS (população 05) – tem pequena extensão e sua nascente situa-se a 1.725 metros de altitude. Dirige-se para o norte, paralelamente ao Ribeirão das Perdizes, distando um do outro, aproximadamente dois quilômetros. No seu curso médio localiza-se uma represa, situada a 1.720 metros de altitude, onde foram efetuadas as coletas. Sua foz localiza-se a jusante da represa, à margem direita do Rio Sapucaí-Guaçu.

c) RIBEIRÃO DO FOJO (população 03) – sua nascente está localizada a 1.880 metros de altitude. O local onde as coletas foram efetuadas situa-se, aproximadamente, a 1.720 metros de altitude, à jusante da Usina Hidrelétrica do Fojo, pertencente à CESP (Centrais Elétricas de São Paulo). Sua foz está localizada a 1.600 metros de altitude, na margem direita do Rio Sapucaí-Guaçu (figura 3.3).

d) REPRESA CAPIVARI (população 04) – situada na Vila Capivari, região central da cidade de Campos do Jordão, a 1.640 metros de altitude. Esse lago é

abastecido por um pequeno afluente do Ribeirão Capivari, que por sua vez é um dos afluentes que forma a cabeceira do Rio Sapucaí-Guaçu (figura 3.4).



FIGURA 3.3: Ribeirão do Fojo a 1.720m de altitude em Campos do Jordão (SP).



FIGURA 3.4: Represa Capivari – Lago do Pedalinho a 1.640m de altitude em Campos do Jordão (SP).

3.1.1.2. BACIA DO RIO PARAÍBA DO SUL

a) RIBEIRÃO PEQUENO (população 02) – este riacho, também chamado de Bicudinho, têm sua nascente situada a 1.200 metros de altitude, na margem direita do Rio Piracuama, que é afluente do Rio Paraíba do Sul. O ponto de coleta, neste ribeirão, situa-se a 700 metros de altitude.

b) RIBEIRÃO GRANDE (populações 06, 07 e 08) – tem sua nascente, aproximadamente, a 1.940 metros de altitude, localizada no município de Pindamonhangaba (SP). Logo após, a 1.800 metros encontra-se a Represa Santa Isabel (Eletropaulo) e abaixo desta ocorre um grande desnível atingindo a altitude de 650 metros. A partir deste ponto este riacho também é conhecido pelo nome de Teteqüera. Suas águas atravessam uma pequena planície e sua foz situa-se na margem esquerda do Rio Paraíba do Sul, à uma altitude de 540 metros. Neste ribeirão foram escolhidos três pontos de coletas: (b.1) um pequeno afluente, em São José dos Alpes, que desemboca na Represa Santa Isabel, a 1.920 metros de altitude (figura 3.5); (b.2) a Represa Santa Isabel, localizada a 1.800 metros de altitude (figura 3.6); (b.3) uma região, a jusante da Represa Santa Isabel, localizada a 700 metros de altitude (figura 3.7).



FIGURA 3.5: Ponto de coleta (b.1) – Ribeirão Grande a 1.920 metros de altitude em Campos do Jordão.



FIGURA 3.6: Ponto de coleta (b.2) – Represa Santa Isabel a 1.800m de altitude em Campos do Jordão.



FIGURA 3.7: Ponto de coleta (b.3) – Jusante da Represa Santa Isabel a 700m de altitude.

3.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados, como auxílio de tarrafas e peneira, um total de 291 exemplares de *A. scabripinnis*, que foram transportados vivos para a Universidade Federal de São Carlos e mantidos em aquários até o momento de extração dos tecidos. Amostras das nadadeiras caudal, dorsal e uma peitoral e tecidos provenientes do fígado e do rim foram coletados e fixados em 2 ml de solução etanol/metanol (1:1), acondicionados em temperatura de aproximadamente -20°C e submetidas à extração de DNA genômico e amplificação via PCR.

TABELA 3.1: Quantidade de indivíduos coletados e analisados por local de coleta.

LOCAIS DE COLETA	Nº INDIVÍDUOS COLETADOS	Nº INDIVÍDUOS ANALISADOS	Nº INDIVÍDUOS COM RESULTADOS
BACIA DO RIO SAPUCAÍ			
Ribeirão da Perdizes (1.770 m)	49	30	05
Ribeirão do Fojo (1.720 m)	04	04	04
Lago do Pedalinho (1.640 m)	20	15	07
Ribeirão da Pedras (1.720 m)	50	25	03
BACIA RIO PARAÍBA DO SUL			
Ribeirão Pequeno (700 m)	05	05	05
Ribeirão Grande – b1(1920 m)	65	10	0
Ribeirão Grande – b2 (1800 m)	51	10	01
Ribeirão Grande – b3 (700 m)	47	10	0
TOTAL	291	109	25

Os exemplares foram identificados, fixados em formol por 2 dias e, posteriormente, transferidos para recipientes com etanol e guardados para eventuais consultas. Apesar de terem sido coletados 291 exemplares de *A. scabripinnis*, apenas 25 indivíduos foram utilizados para as análises filogeográficas. A tabela 3.1 mostra o número de indivíduos analisados por local de coleta.

3.2. MÉTODO

3.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico de tecidos sólidos (nadadeira) foi feita utilizando-se a técnica de extração salina de ALJANABI & MERTINEZ (1997) com algumas modificações.

A nadadeira previamente fixada em etanol:metanol foi lavada com água destilada para retirar o excesso de álcool e colocada em um Eppendorf de 2 ml, juntamente com 800µL de solução de digestão (NaCl 0,4M; Tris-HCl pH 8,0 10mM; EDTA pH 8,0 2mM). Para que todo o tecido ficasse recoberto pela solução, ele foi cortado em partes pequenas. Se a quantidade de tecido era muito pequena, o volume de solução de digestão foi diminuído pela metade (400µL). A amostra foi, então, homogeneizada rapidamente e em seguida adicionou-se 80µl de SDS 20% e 16µl de Proteinase K 20mg/ml. Feito isso, os tubos de Eppendorf foram levados em banho-maria a 60°C (temperatura de ativação da enzima proteinase), durante 2 horas. A cada 30 minutos as amostras eram agitadas levemente para homogeneização do material. Após a incubação, foram adicionados 300µl de uma solução saturada de NaCl 6M em cada amostra, que foram misturadas em vortex em

velocidade máxima por 30 segundos, permitindo que o sal entrasse em contato com as moléculas de DNA, e centrifugadas por 30 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante formado foi transferido para um novo tubo, previamente etiquetado, com o auxílio de uma pipeta, e os tubos contendo o material sedimentado foram descartados. Um volume igual de isopropanol a temperatura ambiente, correspondente ao volume do sobrenadante, foi adicionado a cada tubo, que foram homogeneizados manualmente até a visualização da formação de uma nuvem esbranquiçada (DNA). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm para que o DNA fosse precipitado formando um *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. As amostras foram levadas para secar em estufa 37°C *overnight* e após este tempo foram ressuspensas em 300 - 500 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) e guardados em freezer a -20°C . O volume de TE dependeu da quantidade de DNA existente.

3.2.2. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Após a extração do DNA genômico foi realizada sua quantificação em gel de agarose 0,8% com o auxílio do marcador de peso molecular LOW MASS (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio da comparação entre o tamanho e intensidade da banda do marcador com o das amostras. Quando verificada a presença de RNA nas amostras, foi acrescentado 1µL de RNase a 10ng/µL para cada 50µL de DNA. Depois de quantificado, 50µl do DNA total foi diluído a fim de se obter uma alíquota de 50ng/µl para uso diário, o restante foi guardado no Banco de DNA como estoque.

3.2.3. AMPLIFICAÇÃO DO LOCO DO CITOCROMO b

Neste trabalho foi utilizado o gene citocromo b mitocondrial, que foi amplificado e isolado, *in vitro*, a partir do DNA total extraído, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A escolha deste gene foi devido às suas características apropriadas para estudos de populações, já demonstradas em trabalhos anteriores (APOSTOLIDIS *et al.*, 1997; LYDEARD & ROE, 1997; PERDICES *et al.*, MEYER, 1994).

O tamanho total do fragmento seqüenciado foi de 850 pares de bases, porém apenas 688pb foram utilizados para a análise das populações. Para a amplificação por PCR foram utilizados dois pares de iniciadores, a fim de dividir o gene em duas partes, facilitando o seqüenciamento. Os *primers* GLUDG-L & CB2-H (PALUMBI *et al.*, 2002), foram utilizados para a amplificação da primeira parte do gene, de aproximadamente 450pb. Esses oligonucleotídeos são considerados universais, pois têm mostrado sucesso na amplificação de todos os vertebrados, incluindo elasmobrânquios, peixes teleósteos e focas. Para o segundo fragmento do gene citocromo b, com tamanho de 500pb, foram utilizados os *primers* CB4a-L & CB3-H (PALUMBI *et al.*, 2002), também considerados universais, pois funcionam em elasmobrânquios, em peixes, mamíferos, pássaros e provavelmente em todos os vertebrados. Esses dois fragmentos apresentaram uma região de, aproximadamente, 100pb de sobreposição, resultando em uma seqüência de 850pb, no final. As seqüências de bases nucleotídicas desses iniciadores estão na tabela 3.2 e a figura 3.11 mostra um esquema das posições relativas desses oligonucleotídeos no gene citocromo b do DNA mitocondrial.

CITOCROMO b

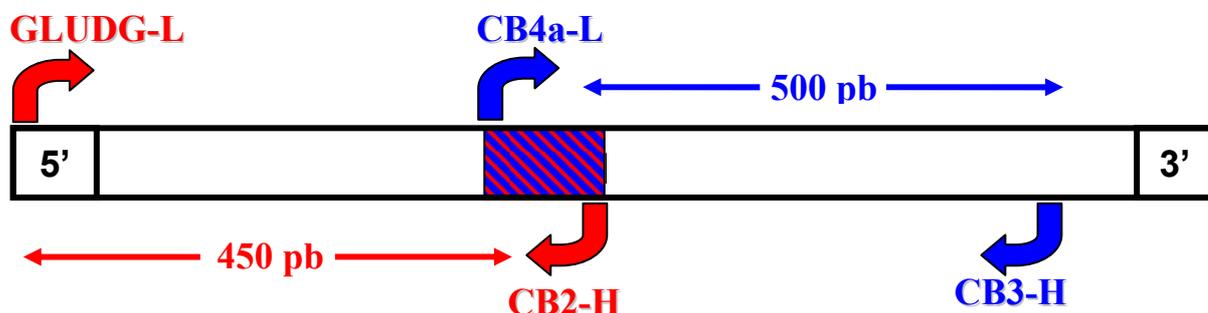


FIGURA 3.11. Posições relativas dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene mitocondrial citocromo b. As letras L e H presentes nos nomes dos oligonucleotídeos estão indicando em qual fita do gene citocromo b esses oligos estarão se ligando, na fita interna – *light* (fita leve), ou na externa – *heavy* (fita pesada). A região destacada corresponde a 100pb de sobreposição dos fragmentos.

TABELA 3.2: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação e seqüenciamento do gene citocromo b mitocondrial. (T_M – temperatura de *melting*)

PRIMERS	ORIENTAÇÃO	SEQÜÊNCIA	T_M (°C)
GLUG-L	<i>Forward</i>	5' TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG 3'	50°C
CB2-H	<i>Reverse</i>	5' CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA 3'	50°C
CB4a-L	<i>Forward</i>	5' CAA AAA GAA ACC TGA AAY ATY GG 3'	45°C
CB3-H	<i>Reverse</i>	5' GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC 3'	45°C

(Pelo fato destes *primers* serem universais eles apresentam algumas bases degeneradas, onde **Y** = C ou T e **R** = G ou A).

As reações de amplificações foram realizadas em tubos Eppendorf próprios para uso em termocicladores e consistiram de 1X de tampão, 1,5mM de cloreto de magnésio, 100µM de dNTP, 12,5pmol do *primer* forward, 12,5 pmol do *primer*

reverse, 1U da enzima Taq polimerase, 50ng do DNA genômico e água milli-Q suficiente para completar o volume final desejado de cada reação. As amostras que, após a reação de amplificação, seriam purificadas com PEG, tiveram volume final de 100µL, enquanto as amostras que seriam purificadas com KIT WIZARD SV gel and PCR clean up systems, tiveram volume final de 50µL.

As PCRs foram realizadas em termociclador GENEAMP PCR System 2400 – Perkin Helmer e/ou MJ Research, INC, modelo PTC 100. O programa de PCR para os primers GLUDG-H e CB3-L consistiu de um passo inicial de desnaturação da fita de DNA a 94°C por cinco (5) minutos, seguido por 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C (30 segundos), temperatura de hibridização de 50°C (30 segundos) e temperatura de extensão de 72°C (40 segundos), finalizando com 20 minutos a 72°C. A reação de amplificação para os *primers* CB4a-H e CB3-L foi igual à reação anteriormente descrita, mudando apenas a temperatura de hibridização para 45°C.

Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 0,8% (0,8 g de agarose, 100 ml TBE) contendo brometo de etídio (0,01µl/ml), após corrida a 130 Volts por 45 minutos, tendo sido aplicado 7µL de cada amostra juntamente com 1µL de Azul de Bromofenol com glicerol. O corante permite a visualização da posição do DNA no gel ao longo da corrida eletroforética e o glicerol faz com que o produto de PCR aplicado entre no pocinho do gel e não flutue no tampão de eletroforese.

Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, aplicou-se um marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). O DNA foi visualizado por fluorescência através de um transluminador equipado com luz ultravioleta. As imagens obtidas nos géis foram registradas utilizando-se o Sistema

de Fotodocumentação EDAS 290 Kodak. Dessa forma, foi possível checar se o fragmento foi amplificado, se a amplificação correspondia ao tamanho esperado e se houve bandas espúrias (bandas extras com tamanhos diferentes do esperado).

3.2.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Com a finalidade de deixar o produto da PCR livre de resíduos de reagentes (dNTPs, *primers*, etc) que podem interferir na reação de seqüenciamento diminuindo sua qualidade, as amostras foram purificadas utilizando-se dois procedimentos distintos.

As amostras que foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI 377 foram purificadas por polietilenoglicol (PEG), um polímero que forma uma malha prendendo o DNA, permitindo que as impurezas fiquem livres para serem eliminadas durante as lavagens. Seguiu-se o protocolo de LIS (1980), com algumas modificações, que consistiu na seguinte seqüência de etapas: aos tubos Eppendorf que continham os produtos de PCR a serem purificados foi adicionado igual volume de solução de PEG (20% polietilenoglicol; 2,5M NaCl). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por mais 15 minutos. O sobrenadante formado em cada amostra foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta automática e descartado. 150µL de etanol 70% gelado foi adicionado ao *pellet* formado no fundo de cada tubo e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. Novamente, o sobrenadante foi cautelosamente descartado por aspiração e mais 150µL de etanol gelado 80% foi adicionado às amostras, que foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e cada tubo contendo os

produtos de PCR purificados foi colocado em uma estufa a 37°C por 15 minutos até a completa evaporação do etanol. Finalmente, os precipitados foram eluídos em 25µL de água milli-Q e guardados no freezer a -20°C. Cada amostra foi quantificada em gel de agarose 1,5%. Este procedimento de purificação, apesar de ser prático e, aparentemente, menos custoso, requer um volume muito grande de produto de PCR (100µL), o que pode tornar inviável sua utilização em termos financeiros.

Algumas amostras foram seqüenciadas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 por exigir um volume menor de produto final de PCR, otimizar os custos e a praticidade da reação, bem como a qualidade das seqüências. Para essas amostras foi utilizado o segundo procedimento de purificação, o *KIT WIZARD SV gel and PCR clean up systems*.

Pelo fato de algumas amostras apresentarem um arraste (anelamento de *primers* em regiões inespecíficas do DNA) juntamente com a banda de amplificação (figura 3.12), o que pode atrapalhar no seqüenciamento, antes de serem purificadas elas foram eluídas do gel de agarose da seguinte forma: todo o produto de PCR (entre 25 e 50 µL) foi aplicado no gel de agarose a 0,6%. Após corrida eletroforética com corrente constante de 110 volts por 40 minutos, o gel foi visualizado em luz ultravioleta rapidamente (pois a UV degrada o DNA) e a região da banda foi cortada e colocada em tubo Eppendorf previamente etiquetado. O protocolo para a purificação do fragmento de DNA do gel foi o do fabricante, que consistiu das seguintes etapas: um volume igual da Solução de Ligação (*Membrane Bind Solution*) foi misturado ao produto de PCR no tubo Eppendorf. A mistura (produto de PCR + solução de ligação) foi transferida para uma mini-coluna com um filtro (componente do kit), que estava sobre um tubo novo e previamente etiquetado e foi incubada por

1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, o tubo juntamente com a coluninha contendo o produto de PCR foram centrifugados por 1 minuto (10.000g); a coluninha foi removida e o líquido que estava no tubo foi descartado. A mini-coluna foi novamente recolocada no tubo Eppendorf e o DNA, que estava preso no filtro da coluna, foi lavado por duas vezes, a primeira com 700µL da solução de lavagem (*Membrane Wash Solution*) e a segunda com 500µL da mesma solução e centrifugado por 5 minutos (10.000g). Após isso, a coluna foi transferida para um Eppendorf 1,5 ml (previamente etiquetado) e 25µL de *Nuclease Free-Water* foram adicionados na coluninha, que foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugada por mais 1 minuto. A coluninha foi então descartada e o produto purificado foi quantificado em gel de agarose 1,5% e guardado no freezer a -20°C.

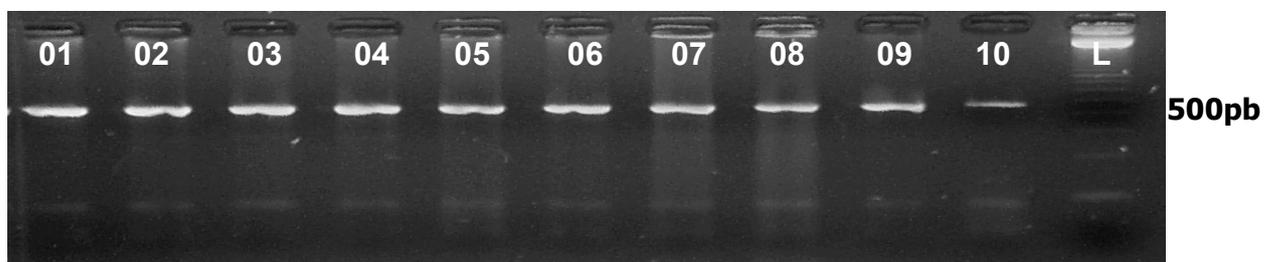


FIGURA 3.12. Produtos de PCR do DNA mitocondrial de *A. scabripinnis* em gel de agarose 1% antes de ser purificado. Os números indicam os indivíduos analisados. L é o marcador de peso molecular e o número na lateral indica seu tamanho.

3.2.5. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA

Após serem purificadas, as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento, realizada com o kit de seqüenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare). Cada reação consistiu de 5µL de DNA molde (produto de PCR purificado com PEG), 2µL de tampão Save-Money (Tris-HCl pH 9.0 –

200mM; MgCl₂ – 5mM), 2µL de Sequencing Reagente Premix (ET DYE) e 1µL de *primer* (*forward* ou *reverse*) a 10 pM. As reações foram feitas uma a uma, ou seja, não foram feitas em placas. O programa de PCR utilizado foi: passo inicial de 96°C por 2 minutos, passo 2: 96°C por 45 segundos (desnaturação), passo 3: 50°C por 30 segundos (hibridização), passo 4: 60°C por 1 minuto (extensão), passo 5: retorna 35 vezes ao passo 2, passo 6: 4°C por tempo indeterminado.

Após a reação de seqüenciamento, o DNA foi precipitado utilizando-se 1/10 do volume de acetato de sódio/EDTA e 40µL de etanol 95%. A solução foi homogeneizada em vórtex e transferida para um tubo de 1,5 ml, previamente etiquetado. As amostras foram deixadas em repouso por 20 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante formado foi descartado. Às amostras, foram adicionados mais 150µL de etanol 70% e em seguida elas foram centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. As amostras foram, então, encubadas em estufa a 37°C por, no máximo, 1 hora. Este passo foi crucial para a reação, pois se o DNA fosse deixado na estufa mais do que o necessário, ele cristalizava e não seria possível o seqüenciamento, por outro lado, se o etanol existente na amostra de DNA não evaporasse totalmente, ele iria atrapalhar o seqüenciamento. Após a secagem, o *pellet* aderido ao fundo do tubo foi ressuspenso utilizando 3µL de *loading buffer* e estocado em freezer a -80°C enquanto não fosse aplicado no seqüenciador. Finalmente o produto foi visualizado, após corrida *overnight*, em um seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems Inc.). Os produtos de PCR que foram purificados com o KIT WIZARD SV gel and PCR clean up systems foram enviados para o Centro de Pesquisas do Genoma Humano –

USP, em São Paulo, para serem seqüenciados em seqüenciador MegaBACE 1000. Todo procedimento da reação de seqüenciamento e os protocolos encontram-se no endereço <http://genoma.ib.usp.br>.

3.2.6. ANÁLISE DOS DADOS

3.2.6.1. Leitura e Alinhamento das Seqüências

Quando as seqüências são obtidas do seqüenciador elas estão na forma bruta, ou seja, precisam ser analisadas e conferidas atenciosamente, uma a uma, pois geralmente as primeiras e as últimas bases de cada seqüência não podem ser aproveitadas, pois são dados incertos. Isso acontece porque o *laser* do seqüenciador ABI 377 não é capaz de ler corretamente fragmentos muito pequenos (até 100pb, aproximadamente) ou muito grandes (maiores que 400 pb, aproximadamente) ou devido à existência de muito ruído (impurezas na amostra) atrapalhando a leitura da seqüência. Sendo assim, as extremidades das seqüências geralmente são retiradas das análises. Os cromatogramas de todas as amostras foram visualizados através do programa computacional CHROMAS versão 2.23 (Technelysium 1998 - 2002), onde foi possível editar as seqüências, encontrar o *frame* de leitura, copiar a seqüência e o frame no formato FASTA ou TXT, além de ser possível fazer o reverse-complement quando necessário.

Para verificar se a região seqüenciada realmente pertencia ao gene citocromo b mitocondrial, foi feito um *blast* na internet, no site <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>, a fim de se encontrar seqüências similares às obtidas no presente trabalho e compará-las. Depois de editadas, as seqüências foram copiadas para o programa BioEdit Sequencer Alignment Editor versão 7.0.5.2 (HALL, 1999), onde foram

alinhas, tendo como referência a seqüência de um grupo externo – *Astyanax mexicanus*, depositada no GenBank sob o número de acesso AF045997. O objetivo do alinhamento é permitir que a cada posição de cada base que esteja sendo comparada entre as seqüências consideradas seja homóloga.

Em uma primeira etapa, os dois fragmentos do gene citocromo b foram alinhados independentemente e editados manualmente. Para a união dos dois fragmentos do gene seqüenciados foi utilizado o programa Crimson Editor 3.70 Release (Freeware, 1999 – 2004), o qual permite trabalhar no modo de coluna facilitando a edição das seqüências. As seqüências já corrigidas pelo CHROMAS e pelo BIOEDIT foram então copiadas para o CRIMSON em formato de texto e os dois fragmentos (450pb + 500pb) de um mesmo indivíduo, foram colocados um abaixo do outro, manualmente alinhados, tendo, portanto, a região de 100 pb sobreposta. Logo abaixo, eram copiados formando-se a seqüência completa deste gene, contendo 801 pares de base. Para auxiliar na contagem dos pares de base, foi utilizada uma régua guia colocada no início da página. As seqüências completas foram copiadas e inseridas no BIOEDIT e em seguida fez-se novo alinhamento com as seqüências completas de todos os indivíduos através do aplicativo CLUSTALW (THOMPSON et al.,1994) existente dentro do pacote BioEdit. Neste programa, o alinhamento é feito em duas etapas: a primeira faz o alinhamento de todas as seqüências par a par e é calculada uma medida de similaridade máxima entre cada duas seqüências. O cálculo dessa medida de similaridade máxima é feito através de um gráfico, cujos eixos representam as duas seqüências comparadas e para cada identidade encontrada entre as bases um ponto é colocado no gráfico. Com base neste gráfico (também chamado de matriz de pontos), o programa irá maximizar a

similaridade entre as duas seqüências utilizando dois tipos de penalidades, a de intervalo e a de substituição. O valor de similaridade final entre cada duas seqüências é, então, calculado com o total de bases idênticas, menos o número de substituições, menos o número de intervalos multiplicado pela penalidade de intervalos. Com esses dados o programa constrói um dendrograma onde nos nós mais internos estarão as seqüências mais semelhantes, a partir das quais o alinhamento múltiplo iniciará. Ou seja, esse programa começa alinhando as seqüências mais semelhantes e em seguida as que se conectam a essas, até que todas estejam alinhadas (RUSSO, 2004).

Como a região seqüenciada é um gene codificante, fez-se a sua tradução em aminoácidos e comparou-se com a seqüência protéica do grupo externo *A. mexicanus*.

3.2.6.2. Análise estatística descritiva

Todas as seqüências de DNA do gene citocromo b mitocondrial obtidas neste trabalho foram analisadas com o auxílio do programa computacional DNA Sequence Polymorphism (DNAsp) versão 4.10 (ROZAS *et al.*, 2003) para a quantificação das variações apresentadas. Foram estimados os seguintes parâmetros:

- (a) sítios polimórficos ou segregantes (S), ou seja, sítios que apresentaram variações entre as seqüências amostradas;
- (b) sítios monomórficos ou invariáveis (I);
- (c) número de haplótipos (h);
- (d) número total de mutações (E);

(e) diversidade haplotípica ou gênica (H_d), ou seja, a medida de variação genética considerando a frequência e o número de haplótipos;

(f) diversidade nucleotídica – P_i , ou seja, o número médio de diferenças mutacionais entre haplótipos;

(g) número médio de diferenças nucleotídicas – k .

3.2.6.3. Análises filogeográfica e filogenética

As relações intraespecíficas (rede de haplótipos) foram construídas pelo programa TCS versão 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000), utilizando as seqüências do citocromo b de 25 indivíduos da espécie *A. scabripinnis* provenientes de seis populações. Através da parcimônia estatística (TEMPLETON, 1998) foi estimada a rede de haplótipos. O algoritmo da parcimônia estatística começa estimando um número máximo de diferenças entre haplótipos como um resultado de substituições únicas, isto é, substituições que não resultaram de substituições múltiplas em um único sitio, com uma confiança estatística de 95%. Este número é chamado de limite da parcimônia ou limite de conexão da parcimônia. Em seguida, haplótipos que diferem de uma mudança são conectados, seguidos pelos que diferem de duas, de três, e assim por diante até que todos os haplótipos sejam incluídos em uma única rede haplotípica, ou até que o limite da parcimônia seja atingido. Este método enfatiza o que é compartilhado entre os haplótipos que diferem minimamente e fornece uma visão empírica do desvio da parcimônia, além de permitir a identificação de haplótipos putativos (POSADA & CRANDALL, 2001).

Seqüências do gene citocromo b já descritas para *A. fasciatus* foram utilizadas juntamente com as seqüências de *A. scabripinnis*, encontradas no presente trabalho,

para uma análise filogenética, a fim de se observar a provável relação entre essas duas espécies. Como grupos externos, foram utilizadas seqüências de três gêneros diferentes, que também apresentaram semelhanças com as seqüências do presente trabalho e pertencem à mesma família de *A. scabripinnis*.

A quantificação das diferenças entre seqüências de DNA pode ser expressa na forma de valores ou distâncias através de métodos de distância. Por outro lado, métodos baseados em caracteres discretos reconstróem a árvore filogenética diretamente a partir dos dados (NEI, 1987; NEI & KUMAR, 2000). Os métodos de distância transformam as variações entre cada duas seqüências em uma única medida de distância, que será usada na estimativa da árvore filogenética final. Já os métodos baseados em caracteres discretos analisam cada sítio separadamente e constroem a árvore final diretamente a partir dos próprios caracteres.

O método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*), desenvolvido por SAITOU & NEI (1987), baseia-se no método de evolução mínima, no qual a árvore com a menor soma total de ramos é procurada (CAVALLI-SFORZA & EDWARDS, 1967; SAITOU & IMANISHI, 1989). O método não examina todas as topologias possíveis, mas procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore (SCHNEIDER, 2003).

Já o método de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) consiste em estimar a probabilidade de um conjunto de dados estar representando um processo que realmente ocorreu, baseando-se na análise dos estados de caráter (SCHNEIDER, 2003).

No presente trabalho, as análises filogenéticas de *neighbor-joining* e máxima verossimilhança (busca heurística), ambas com 1100 réplicas de *bootstrap*, foram

calculadas pelo programa PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2003) e as duas árvores com princípios de análises diferentes foram comparadas. O programa MODELTEST versão 3.06, desenvolvido por POSADA & CRANDALL (1998), foi usado para escolher o método mais apropriado de substituição nucleotídica para as análises filogenéticas das seqüências. Ele compara modelos progressivamente mais complexos através da estatística LRT (*log-likelihood ratio*) e escolhe o modelo de evolução do DNA que melhor se ajusta aos dados observados (SCHNEIDER, 2003).

3.2.6.4. Análise das variações cariotípicas versus variações moleculares

As variações citogenéticas já descritas para as populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão; (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a; FERRO *et al.*, 2001; VICENTE & GALETTI JUNIOR, 1994) foram comparadas com os resultados moleculares do presente trabalho. A variação cromossômica utilizada para esta análise foi a presença e/ou ausência de cromossomos supranumerários, pois estas populações apresentam o mesmo padrão de número cariotípico ($2n = 50$) e de heterocromatina constitutiva (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a; FERRO *et al.*, 2001). No entanto, algumas populações podem apresentar uma atividade diferencial das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), que parecem ser menos ativas em populações de maiores altitudes (FERRO *et al.*, 2001).

Estas populações podem apresentar três tipos distintos de cromossomos Bs, ou seja, metacêntrico grande (B_M), submetacêntrico grande (B_{SM}) e metacêntrico pequeno (B_m) (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a;

FERRO *et al.*, 2001), sendo já verificada também a ocorrência de triploidia natural (VICENTE *et al.*, 1996).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Apesar de terem sido coletados indivíduos de oito localidades da região de Campos do Jordão, duas não apresentaram resultados satisfatórios para as análises devido às falhas de seqüenciamento das seqüências. Nas demais seis populações, 688 pares de bases (pb) do citocromo b de 25 indivíduos de *A. scabripinnis* foram consideradas para as análises filogeográficas. O fragmento seqüenciado corresponde às posições 114 a 801 do mesmo gene em *A. mexicanus* (GenBank AF045997). O alinhamento das seqüências utilizadas e de suas respectivas traduções em aminoácidos encontram-se nos anexos 1 e 2, respectivamente.

Depois das seqüências terem sido editadas e alinhadas com auxílio dos programas computacionais CHROMAS e BIOEDIT, respectivamente, elas foram submetidas às análises descritivas através do programa DNAsp. Foi identificado um total de 11 haplótipos (h), 12 sítios polimórficos ou segregantes (S) e 676 sítios monomórficos ou invariáveis (I). Foi observado um total de 12 mutações (E), a diversidade nucleotídica (Pi) foi 0,00283, a diversidade haplotípica encontrada (Hd) foi 0,8300 e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) foi de 1,947.

A tradução das seqüências de nucleotídeos em aminoácidos, que foi realizada com o auxílio dos programas CHRIMSON EDITOR e BIOEDIT, mostrou a ocorrência de poucas alterações não-sinônimas, pois apenas alguns indivíduos apresentaram diferenças nos aminoácidos (ver anexo 2).

4.2. ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS E SUAS DISTRIBUIÇÕES

As 25 seqüências analisadas apresentaram 11 haplótipos diferentes, nomeados de A até K, dos quais 10 (5 individuais) foram exclusivos, ou seja, apareceram em apenas uma população. Dentre os haplótipos presentes em mais de um indivíduo, o haplótipo A foi considerado ancestral de todos os outros e o mais freqüente, sendo compartilhado por 4 populações, 2 pertencentes à Bacia do Sapucaí-Guaçu (Ribeirão das Perdizes e Ribeirão do Fojo) e 2 à Bacia do Paraíba do Sul (Ribeirão Grande e Ribeirão Pequeno). A população do Lago do Pedalinho apresentou a maior diversidade haplotípica ($H_d = 0,905$) e todos os haplótipos foram exclusivos, ou seja, não foram encontrados em nenhuma outra população. A menor diversidade haplotípica foi encontrada na população do Córrego das Pedras ($H_d = 0,00$), pois houve a ocorrência de apenas 1 haplótipo, que também foi exclusivo deste grupo de peixes. Para a população do Ribeirão Grande, não foi possível calcular a diversidade haplotípica, pois houve apenas 1 indivíduo analisado. A tabela 4.1 mostra a relação das populações estudadas, o número de indivíduos analisados em cada uma delas, seus respectivos haplótipos, a diversidade haplotípica (H_d) e a diversidade nucleotídica (P_i). O mapa da figura 4.1 contém os haplótipos distribuídos dentro das localidades onde foram encontrados.

TABELA 4.1. Populações amostradas; número de indivíduos analisados por população, haplótipos presentes em cada localidade, representados pelas letras de **A** a **K**. Os números entre parêntese indicam a quantidade de vezes que determinado haplótipo foi encontrado na população correspondente. Hd é a diversidade haplotípica e Pi é a diversidade nucleotídica de cada população.

POPULAÇÃO	Nº INDIVÍDUOS	HAPLÓTIPOS	Hd	Pi
Ribeirão das Perdizes	05	A (04); B (01)	0,40	0,00058
Córrego das Pedras	03	C (3)	0,00	0,00
Ribeirão do Fojo	04	A (02); E (02)	0,667	0,00097
Lago do Pedalinho	07	F (01); G (01); H (01); J (02); K (02)	0,905	0,00360
Ribeirão Pequeno	05	A (03); D (01); I (01)	0,70	0,00233
Ribeirão Grande	01	A (01)	—	—
TOTAL	25	A (10); B (01); C (03); D (01); E (03); F (01); G (01); H (01); I (01); J (02); K (02)	0,83	0,00283

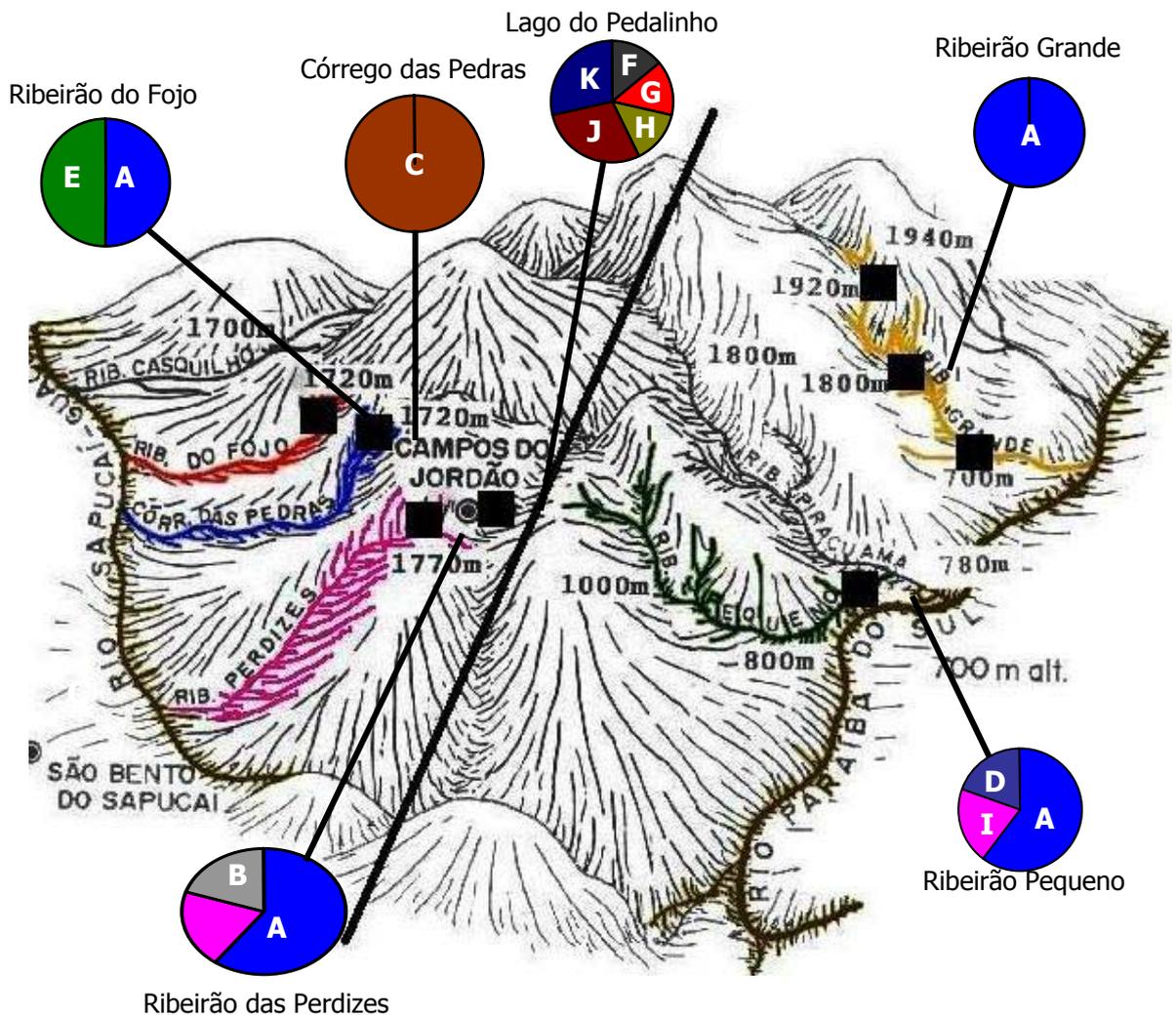


FIGURA 4.1. Mapa dos pontos de coleta da região de Campos do Jordão, com os respectivos haplótipos de cada população. Os gráficos em pizza correspondem à porcentagem em que cada haplótipo é encontrado na respectiva população. Cada haplótipo é representado por uma letra (A até K) e por uma cor diferente.

4.3. ANÁLISES FILOGEOGRÁFICA E FILOGENÉTICA

Na figura 4.2 estão representadas as relações dos haplótipos com suas respectivas áreas de ocorrência sobre o mapa da região de Campos do Jordão. As relações entre os haplótipos são mostradas na figura 4.3 na forma de uma rede haplotípica gerada pelo TCS.

Na rede de haplótipos pode-se observar a ocorrência de duas homoplasias, uma relacionada entre o Lago do Pedalinho e o Ribeirão do Fojo e outra envolvendo este mesmo lago e o Ribeirão Pequeno. Na análise filogenética, o aparecimento independente das mesmas características derivadas, ou seja, uma mesma condição apomórfica (derivada) surgindo mais de uma vez na história evolutiva de uma população, é considerado paralelismo ou convergência, e denominados em conjunto, homoplasias. (AMORIM, 2002).

Na relação homoplástica entre o Lago do Pedalinho e o Ribeirão do Fojo, considerando-se a hipótese de que o haplótipo G seja uma condição apomórfica (derivada), pode-se dizer que ele tenha surgido por convergência ou por paralelismo a partir do haplótipo H ou E, que são as condições plesiomórficas para este caráter. O mesmo ocorre em relação à homoplasia do Ribeirão Pequeno com o Lago do Pedalinho quanto ao haplótipo F.

Em 4 das 6 populações estudadas, sendo duas pertencentes à Bacia do Sapucaí-Guaçu (Ribeirão das Perdizes e Ribeirão do Fojo) e duas pertencentes à Bacia do Paraíba do Sul (Ribeirão Grande e Ribeirão Pequeno), foi encontrado o haplótipo A. Apesar de ter sido o haplótipo mais freqüente, não foi verificada a sua ocorrência em duas populações, no Córrego das Pedras, cuja região de coleta foi uma represa situada em seu percurso médio, e no Lago do Pedalinho, também uma população particularmente isolada. O único haplótipo encontrado no Córrego das Pedras (haplótipo C) foi exclusivo desta população, igualmente aos encontrados no Lago do Pedalinho (haplótipos F, G, H, J e K). Nas populações do Ribeirão das Perdizes, Ribeirão do Fojo e Ribeirão Pequeno foram encontrados haplótipos exclusivos, sempre se originado do ancestral A. A não detecção

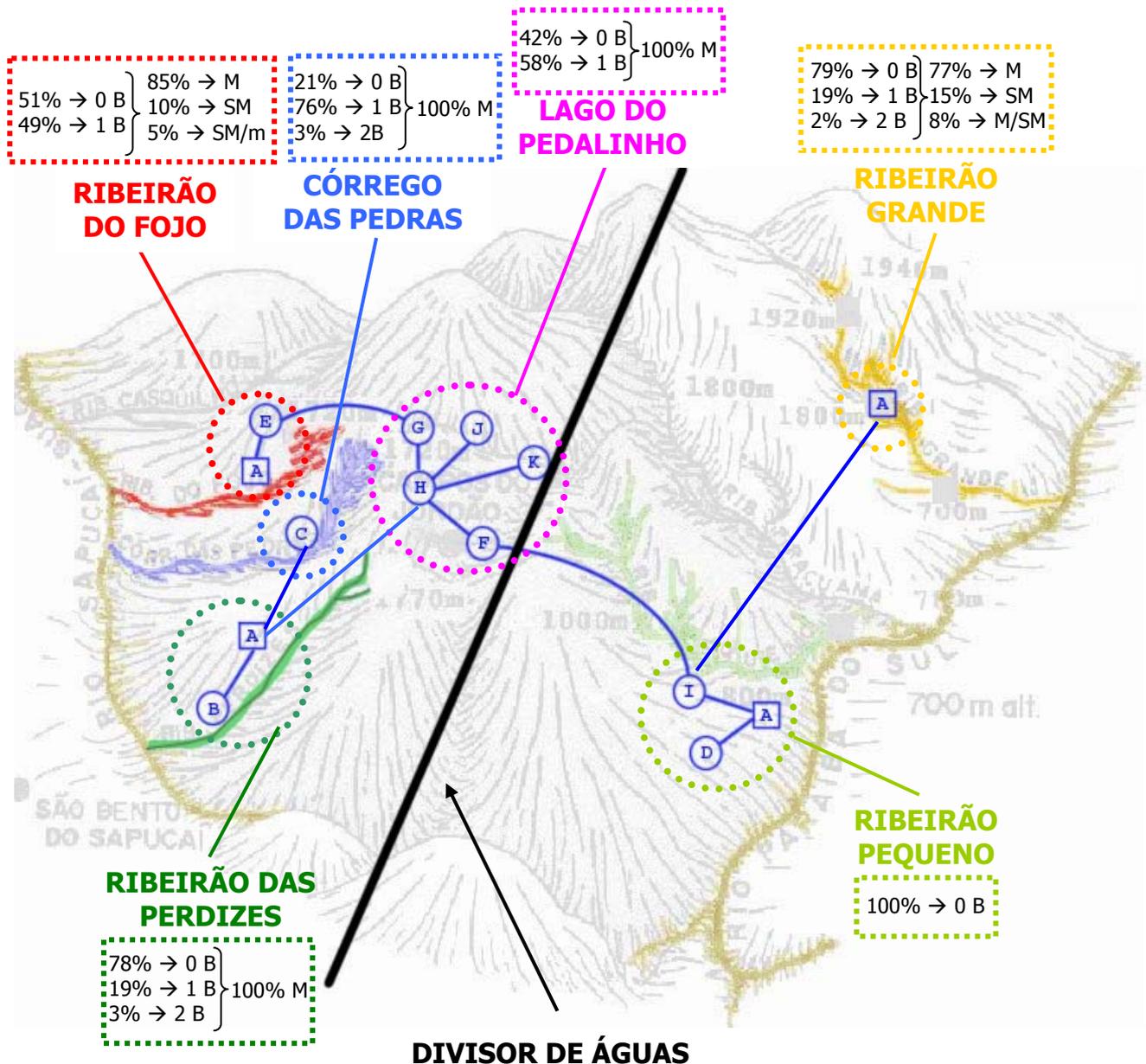


FIGURA 4.2. Rede de haplótipos representada sobre o mapa da região de Campos do Jordão, evidenciando as relações entre as populações estudadas e seus haplótipos: Ribeirão do Fojo (FERRO *et al.*, 2001), Córrego das Pedras (MESTRINER *et al.*, 2000; VICENTE *et al.*, 1996), Lago do Pedalinho (FERRO *et al.*, 2001), Ribeirão das Perdizes (VICENTE *et al.*, 1996), Ribeirão Grande (NEO *et al.*, 2000b) e Ribeirão Pequeno (VICENTE & GALETTI JUNIOR, 1994). As letras dentro dos círculos são os haplótipos encontrados em cada localidade, o haplótipo ancestral (A) está representado dentro dos quadrados. As linhas são passos mutacionais que unem dois ou mais haplótipos. Os haplótipos que se agrupam à direita (A, D e I) são pertencentes às populações da bacia do rio Paraíba do Sul; os haplótipos à esquerda pertencem às populações da bacia do rio Sapucaí-Guaçu. A linha preta cortando o mapa evidencia o divisor de águas. Os círculos tracejados estão delimitando os haplótipos encontrados nas respectivas localidades. Os retângulos tracejados contêm as ocorrências de cromossomo B, já descritas na literatura, onde M – metacêntrico grande; SM – submetacêntrico; m – metacêntrico pequeno.

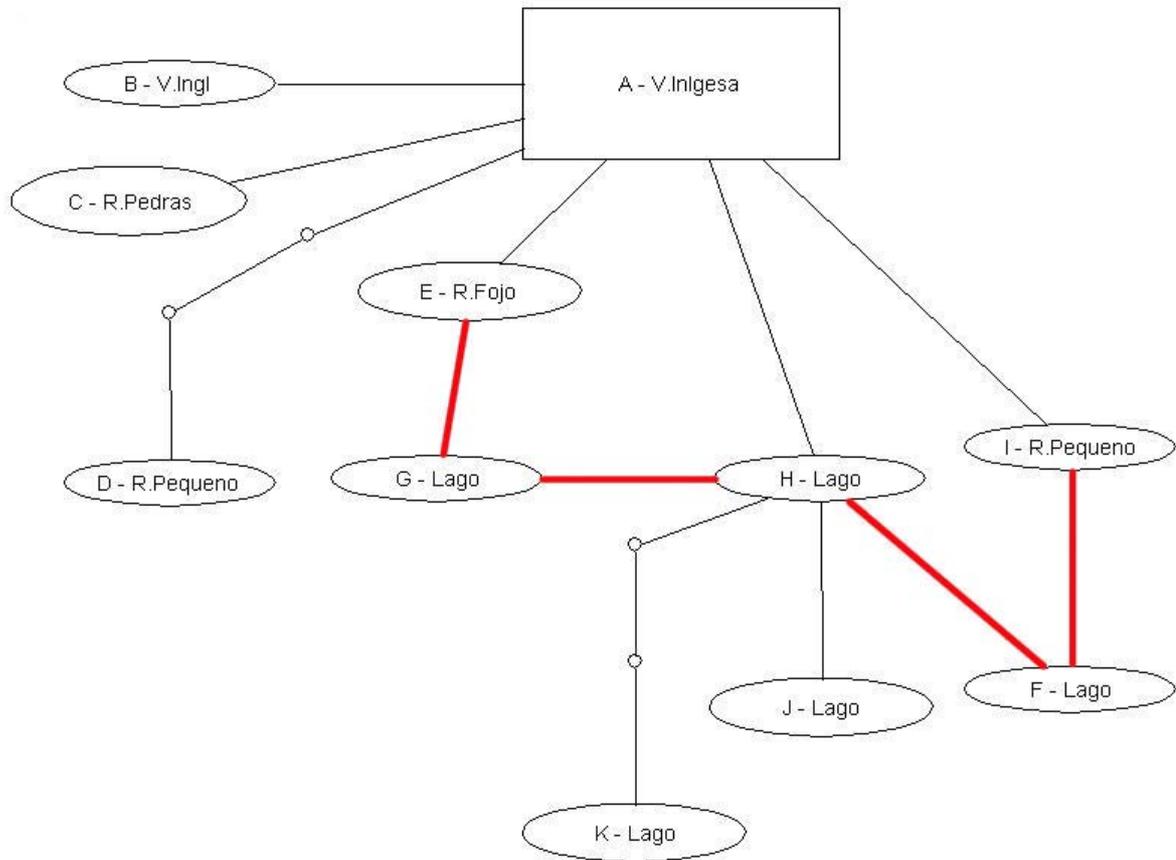


FIGURA 4.3. Rede de haplótipos gerada pelo programa TCS, conectando os diferentes haplótipos encontrados nas populações de *A. scabripinnis* estudadas. Cada linha corresponde a um passo mutacional; os círculos vazios encontrados entre um haplótipo e outro simboliza haplótipos intermediários gerados pelo próprio programa e que não foram encontrados nas amostras, mas são necessários para interconectar os existentes; as letras de A até k correspondem aos haplótipos e o nome precedente à letra é o local onde o respectivo haplótipo foi encontrado; o haplótipo dentro do retângulo é considerado ancestral; as linhas vermelhas indicam possíveis homoplasias entre os haplótipos.

de outros haplótipos na população do Ribeirão Grande pode ser devido ao reduzido número amostral.

Na figura 4.2 estão representadas as ocorrências do cromossomo B, já descritas na literatura, em conjunto com os haplótipos obtidos no presente trabalho.

Todas as populações aqui estudadas são descritas com um número cromossômico $2n = 50$, número fundamental (NF) = 88, além da ocorrência de cromossomos B (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a; FERRO *et al.*, 2001), exceto a população do Ribeirão Pequeno, que não apresenta esse cromossomo supranumerário. Estas populações apresentam seis cromossomos metacêntricos, 22 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a; FERRO *et al.*, 2001).

Nas populações do Lago do Pedalinho, do Ribeirão das Perdizes e do Córrego das Pedras há ocorrência apenas do cromossomo B metacêntrico grande (VICENTE *et al.*, 1996; MESTRINER *et al.*, 2000; 2000a; FERRO *et al.*, 2001), enquanto que a variação haplotípica encontrada nestas mesmas populações pode ser classificada como alta (cinco haplótipos), média (dois haplótipos) e baixa (um haplótipo), respectivamente.

As populações do Ribeirão do Fojo e do Ribeirão Grande apresentam as três formas de cromossomos B, ou seja, metacêntrico grande, submetacêntrico e metacêntrico pequeno. No entanto essa variação cariotípica não é correspondida molecularmente, visto que a população do Ribeirão do Fojo tem apenas dois haplótipos. O Ribeirão Grande não será considerado, pois foi analisado apenas um indivíduo.

Já a população do Ribeirão Pequeno, onde não há registros de ocorrência de cromossomos supranumerários (VICENTE & GALETTI JUNIOR, 1994), a variação haplotípica não foi menor em relação às demais populações, pois houve a ocorrência de três haplótipos distintos.

Nas análises filogenéticas as árvores obtidas pelos métodos de *neighbor-joining* (figura 4.4) e máxima verossimilhança (figura 4.5), ambas com 1100 réplicas de bootstrap, apresentaram topologias muito semelhantes. As duas espécies comparadas, ou seja, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis* mostraram-se claramente separadas, com um valor de *bootstrap* máximo (100) para *neighbor-joining*.

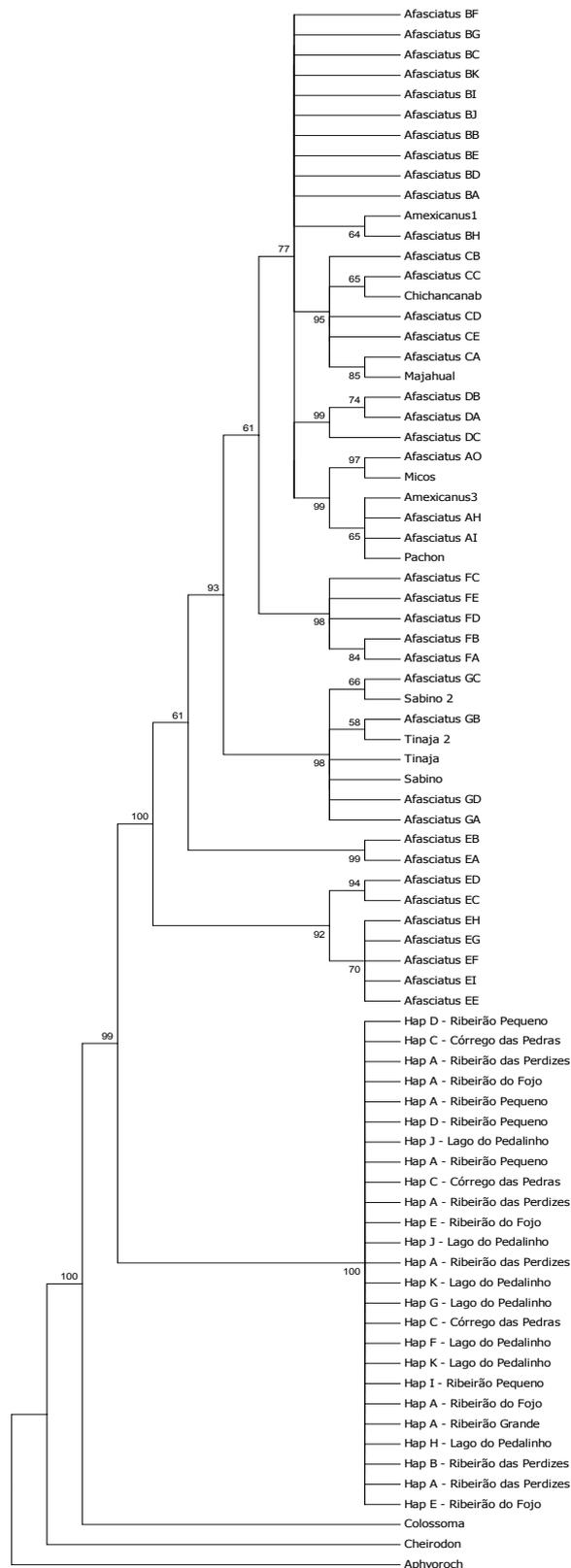


FIGURA 4.5 Reconstrução filogenética obtida pelo método de máxima verossimilhança considerando as seqüências de *A. scabripinnis* (Haplótipo A até K) e *A. fasciatus*, considerando o modelo de substituições nucleotídicas F81+I determinado pelo programa MODELTEST; bootstrap com 1000 réplicas.

5. DISCUSSÃO

As populações de *A. scabripinnis* situadas na região de Campos do Jordão (SP, Brasil) têm merecido uma atenção especial, devido às particularidades geográficas ali presentes que permitem o estabelecimento de diversas populações isoladas nas cabeceiras de pequenos riachos.

Muitos trabalhos têm fornecido informações sobre esta espécie, revelando a grande dificuldade em se explicar a enorme diversidade cariotípica, variando desde o número diplóide até a ocorrência de cromossomos supranumerários, bem como a plasticidade fenotípica que este grupo de peixes apresenta. FERRO (2000) conclui que mesmo populações que se caracterizam por uma estrutura cariotípica aparentemente estável, como as de Campos do Jordão, variações genômicas mais internas podem estar ocorrendo. ABEL (2001) estudando populações de *A. scabripinnis* de um riacho da bacia do São Francisco, encontrou conformações estruturais distintas no DNAr (DNA ribossômico) 45S, porém observou um alto grau de conservadorismo dos seus sítios de DNAr 5S, mostrando a ocorrência de diferentes taxas de variação dentro do genoma. Os esforços para o entendimento de importantes processos evolutivos nestes peixes devem incluir estudos de sistemática, morfologia, comportamentais e ecológicos. A estrutura filogenética é de máxima importância para a interpretação e comparação de relações intra e interespecíficas. O presente trabalho é pioneiro em estudar essas populações de *A. scabripinnis* em Campos do Jordão sob o ponto de vista filogeográfico através de marcadores genético moleculares, nesse caso o citocromo b.

Para essa análise, foi utilizado um fragmento do gene mitocondrial citocromo b de apenas 688 pares de bases. Aparentemente, pode parecer uma seqüência

curta, no entanto, seqüências nucleotídicas muito grandes nem sempre são as mais favoráveis, pois elas podem conter regiões com variabilidade diferente, ou seja, com taxas de evolução diferentes. Dessa forma, as reconstruções filogenéticas poderão ser prejudicadas, pois haverá conflitos entre uma região com muito ruído (aquela que evolui mais rapidamente no gene) e outra pouco informativa (aquela muito conservada) (MATIOLI, 2004). IGUCHI e colaboradores (1999) utilizando apenas 350 pares de bases da região controladora do DNA mitocondrial, verificaram uma redução na variação genética em populações de *Plecoglossus altivelis*, um peixe japonês de importância comercial, cultivadas por muitas gerações. STRECHER e colaboradores (2004) também utilizaram o seqüenciamento de 604 pb do citocromo b para estudar a sistemática e a filogeografia de populações de caverna e de superfície de *A. fasciatus*.

Por outro lado, a vantagem de se trabalhar com mais nucleotídeos é que o erro de amostragem associado ao tamanho finito da seqüência é diminuído (NEI, 1986). HALSBERGHE (2006) utilizou 1.141 pb do citocromo b para estimar a relação filogeográfica intraespecífica do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* e CALCAGNOTTO e colaboradores (2005) estudaram as relações filogenéticas entre peixes Characiformes utilizando, dentre outros genes, 1.014 pb do citocromo b. Estes trabalhos confirmam a utilidade do DNA mitocondrial, tanto para análises populacionais como interespecíficas, mostrando que fragmentos aparentemente pequenos podem ser confiáveis quanto às informações filogenéticas que eles fornecem. Aproximadamente 70% dos estudos filogeográficos envolvem análise do DNA mitocondrial animal (AVISE, 2000).

O citocromo b, um gene do DNA mitocondrial, tem uma taxa de evolução, calibrada para peixes de água doce, de 1,5% a 2% por milhão de anos (ZARDOYA & DOADRIO, 1999), ou seja, é um gene com uma taxa evolutiva ideal para análises de populações que se divergiram há não muito tempo, para evitar que os sítios estejam saturados.

O presente trabalho mostrou baixa diversidade nucleotídica (0,00283) para as populações de *A. scabripinnis* e a maioria das mutações ocorridas foi sinônima, ou seja, não causou alteração no aminoácido. Apenas as populações do Lago do Pedalinho e do Córrego das Pedras apresentaram indivíduos com algumas substituições não-sinônimas (anexo 2). PELIÇÃO-DARDIS (2006), utilizando o marcador molecular citocromo b, também encontrou uma diversidade nucleotídica baixa (0,00692) em populações de *A. altiparanae*.

Dados de citogenética também têm deixado bastante evidente a baixa diversidade cariotípica que esta espécie apresenta na região de Campos do Jordão, no entanto algumas variações são bem marcantes, principalmente as relacionadas à ocorrência de cromossomos supranumerários. FERRO (2000) destaca o fato de que todas as populações de *A. scabripinnis* de Campos do Jordão que apresentaram uma menor frequência de NORs, ou seja, de uma a três, são também portadoras de cromossomos Bs, enquanto que populações sem cromossomos Bs evidenciaram um número maior de cistrons ribossômicos ativos (8 a 11). Porém, a população do Lago do Pedalinho foi considerada uma exceção, pois o cromossomo B metacêntrico grande foi o único tipo encontrado em 58% dos indivíduos analisados e o número máximo de NORs encontradas nesta população foi quatro (FERRO *et al.*, 2001). Os resultados citogenéticos também mostram uma alteração exclusiva na população do

Córrego das Pedras, onde foi observada a ocorrência de duas fêmeas triplóides natural portadora de dois cromossomos Bs metacêntricos grandes (MAISTRO *et al.*, 1994 *et al.*, 2000; VICENTE *et al.*, 1996).

No entanto, apesar de uma variação cromossômica significativa marcada pela ocorrência de indivíduos portadores de nenhum, um ou dois cromossomos B na população do Córrego das Pedras, a diversidade haplotípica foi igual a zero devido à ocorrência apenas do haplótipo C. Assim, os resultados do Lago do Pedalinho e do Córrego das Pedras indicam a ausência de uma relação evolutiva direta entre os cromossomos supranumerários e o gene citocromo b, mas por outro lado tanto a citogenética, como a genética molecular, estão mostrando que estas duas populações apresentam um caminho evolutivo diferenciado em relação às demais populações, pois apresentaram alterações exclusivas, ou seja, que não foram verificadas nas demais.

As populações do Córrego das Pedras e do Lago do Pedalinho apresentaram apenas cromossomos B metacêntrico grandes, que são encontrados em alta frequência e exclusivo em diversas outras populações desta espécie, não apenas da região de Campos do Jordão. Já as formas variantes deste cromossomo supranumerário (submetacêntrico e metacêntrico pequeno) são mais raras e detectadas apenas em algumas populações de Campos do Jordão. Tal ocorrência aponta para o fato de que os Bs variantes devem ter uma origem mais recente, mantendo-se nas populações sem detrimento do B metacêntrico original (FERRO, 2000). Referindo-se às duas populações citadas acima, pode-se sugerir duas hipóteses: ou que são populações que se formaram muito recentemente e ainda não houve tempo suficiente para o surgimento dos tipos variantes de cromossomos B, ou

por ação do efeito fundador apenas o B ancestral se manteve. Se a segunda hipótese é verdadeira, o efeito de fundador na manutenção do cromossomo B ancestral não refletiu na manutenção do haplótipo mitocondrial ancestral (A), tendo em vista que ele não está presente em ambas as populações.

A partir da rede de haplótipos encontrada neste trabalho, foi possível verificar três aspectos interessantes que serão discutidos a seguir.

O primeiro aspecto se refere à diversidade haplotípica apresentada pelas populações estudadas ($H_d = 0,8300$), pela qual foi possível observar a ocorrência de um haplótipo comum (haplótipo A) em 4 das 6 populações, evidenciando um possível haplótipo ancestral: duas delas pertencentes à Bacia do Rio Sapucaí-Guaçu – Ribeirão das Perdizes e Ribeirão do Fojo – e duas, pertencentes à Bacia do Rio Paraíba do Sul – Ribeirão Pequeno e Ribeirão Grande. Estas duas bacias são separadas geograficamente pela Serra da Mantiqueira, evidenciando que não há possibilidade de ocorrência de fluxo gênico natural entre populações por ela separadas.

Esse resultado corrobora a hipótese de que anteriormente, ao soergimento da Serra da Mantiqueira, todas estas populações vivam em simpatria, formando um único grupo populacional MOREIRA-FILHO (comunicação pessoal). Além disso, trabalhos citogenéticos também têm mostrado que o número diplóide ($2n = 50$) e a estrutura cariotípica em 12 populações da região de Campos do Jordão, analisadas até o momento, são bastante conservados, apesar da ocorrência de cromossomos B em algumas destas populações (FAUAZ, VICENTE & MOREIRA-FILHO, 1994; FERRO *et al.*, 2001; NÉO *et al.*, 2000; MESTRINER *et al.*, 2000; VICENTE & GALETTI JUNIOR, 1994).

Por outro lado, MOYSÉS & ALMEIDA-TOLEDO (2002) analisando cinco espécies do gênero *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. lacustris*, *A. scabripinnis paranae* e *A. schubarti*) das bacias do Alto Paraná e do São Francisco, através de RFLP do DNA mitocondrial, encontraram valores moderados a altos de diversidades haplotípicas em todas as populações, com exceção da população de *A. scabripinnis paranae* do Rio Tietê que apresentou baixos valores de diversidade haplotípica. Contrariamente à diversidade cariotípica e fenotípica até então apresentada por essa espécie nestas localidades, a baixa diversidade haplotípica dentro de cada população poderia ser explicada, segundo os mesmos autores, por uma redução da variabilidade genética devido à deriva, uma vez que são populações pequenas e isoladas umas das outras.

A deriva genética é uma das forças evolutivas responsável por mudanças aleatórias na frequência alélica em populações finitas, e toda mudança alélica causada pela deriva se acumula com o tempo. A tendência de um alelo na população é ir para frequência zero (perder-se) ou frequência um (fixar-se), por isso que a deriva leva à perda de variação genética dentro das populações subdivididas, mas aumenta a variação entre elas. Em uma geração esta força evolutiva está centrada na frequência alélica da geração anterior, mas as frequências alélicas de gerações mais antigas são irrelevantes. Portanto, simplesmente por ação da deriva genética, uma população não tem tendências de retornar às suas frequências alélicas ancestrais, mas sim, a cada geração desviar-se cada vez mais das condições iniciais (TEMPLETON, 2003).

Um fator interessante foi a detecção do haplótipo A no Ribeirão Grande, onde apenas um indivíduo apresentou resultado com sucesso. Isso evidencia a possível

freqüência elevada deste haplótipo nesta população. De acordo com a teoria da coalescência (HUDSON, 1990), o haplótipo A pôde ser considerado o mais antigo dentre os haplótipos encontrados no presente trabalho. Os três princípios fundamentais da teoria da coalescência dizem que (1) depois de passado tempo suficientemente longo, todos os genes de um loco de uma determinada população, devem descender, cada um deles, de uma única cópia de um determinado gene presente na população inicial; (2) todas as outras linhagens alélicas extinguiram-se e (3) a probabilidade de uma linhagem alélica existente ter se originado a partir de um determinado gene ancestral, é diretamente proporcional à freqüência inicial deste gene (HARTL & CLARK, 1989).

Dessa forma pode-se inferir que na grande população ancestral formada por essa espécie, anteriormente à separação pela Serra da Mantiqueira, havia haplótipos ancestrais, dentre eles, o haplótipo A. Com o soerguimento da Serra da Mantiqueira, constituído por vários movimentos tectônicos em épocas diferentes (MODENESI, 1988), o grande grupo de *A. scabripinnis* começou a se separar, formando populações isoladas umas das outras e levando ao espalhamento do haplótipo ancestral por toda a região. Isoladas, essas populações passaram a evoluir de forma independente (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MAISTRO *et al.*, 1994b), fazendo com que os novos haplótipos que surgissem ficassem restritos à área de ocorrência da população devido ao isolamento geográfico. Esse fato mostra que a deriva genética não tem direção e não é possível prever resultados precisos ou mesmo a direção da mudança em uma população específica (TEMPLETON, 2003).

Essa hipótese também pode ser estendida para a ocorrência do cromossomo B, pois provavelmente ele se encontrava presente na população ancestral e com a

fragmentação deste grupo de peixes pelo soerguimento da Serra, cada população foi constituída por diferentes freqüências deste cromossomo. Isso se confirma pela ocorrência, em uma mesma população, de indivíduos sem B e com B. Esse cromossomo supranumerário pode não estar representando nenhum fator adaptativo aos seus portadores, mas simplesmente tentando se fixar nas populações como um alelo neutro.

Um alelo neutro é funcionalmente equivalente ao seu alelo ancestral em termos de suas chances de ser replicado e passado para a próxima geração. Apesar da força da deriva genética ser inversamente proporcional ao tamanho populacional, a teoria neutra de Motoo Kimura não depende do tamanho da população, pois considera a interação entre a deriva genética e a mutação e todos os genes são igualmente prováveis de serem fixados (TEMPLETON, 2003).

O segundo aspecto importante que a rede haplotípica aponta é para a ocorrência de haplótipos exclusivos em todas as populações estudadas, exceto no Ribeirão Grande, devido à análise de apenas um único indivíduo dessa localidade. Estes haplótipos podem ser considerados mais recentes, sendo formas derivadas que aparecem conectadas a haplótipos ancestrais nas extremidades da rede. Tal ocorrência mostra uma provável evolução independente entre essas populações, corroborando a hipótese de que, atualmente, são encontradas isoladas geograficamente umas das outras com ausência de fluxo gênico (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991).

A seleção natural não é a única força evolutiva capaz de gerar padrões geográficos em características genéticas, pois em populações que foram historicamente separadas e experimentaram pouco ou nenhum fluxo gênico, a

divergência evolutiva age implacavelmente tanto em genes seletivamente neutros como em genes não neutros (AVISE, 2000).

Uma terceira observação importante que pôde ser inferida a partir da árvore de haplótipos foi a ocorrência de duas homoplasias relacionadas com o ribeirão do Fojo, com o Lago do Pedalinho e com o ribeirão Pequeno. Na realidade, essas homoplasias existem, mas o programa computacional não teve poder estatístico para poder resolvê-la. Sendo assim, cabe ao pesquisador decidir qual o melhor caminho evolutivo, ou seja, qual o fato mais provável de ter acontecido nestas populações.

Em análises filogenéticas há um critério metodológico de decisão, denominado parcimônia, pelo qual se faz a opção pela hipótese mais econômica, ou seja, se existem diversas explicações para uma determinada observação, adota-se aquela que exige o menor número de pressuposições. Sendo assim, a relação encontrada entre o Ribeirão Pequeno e o Lago do Pedalinho não parece ser a mais parcimoniosa, pois são duas populações que provavelmente não tiveram contato físico no passado (pois o Lago do Pedalinho é uma população recente) e, atualmente, encontram-se fisicamente separadas pela Serra da Mantiqueira. VICENTE & GALETTI JUNIOR (1994) estudando a população do Ribeirão Pequeno não encontraram indivíduos portadores de cromossomo B, enquanto que no Lago do Pedalinho 58% dos indivíduos analisados por FERRO e colaboradores (2001) apresentaram um cromossomo B metacêntrico grande, também encontrado na população do Ribeirão do Fojo (FERRO *et al.*, 2001). Estes fatos reforçam a possibilidade do Lago do Pedalinho estar se ligando ao Ribeirão do Fojo e não ao Ribeirão Pequeno na rede de haplótipos.

É interessante observar, ainda, que a população do Lago do Pedalinho apresentou a maior diversidade haplotípica, ou seja, a análise de sete indivíduos dessa localidade detectou cinco haplótipos diferentes, porém o haplótipo A não foi encontrado. Soma-se a essa diversidade pronunciada, o fato de que os indivíduos coletados nesta localidade geralmente apresentaram um tamanho maior em relação aos demais das outras populações. O Lago do Pedalinho está situado em uma região urbanizada de Campos do Jordão e totalmente alterado pela ação humana o que pode estar levando à composição haplotípica atual.

Entretanto, o efeito fundador também pode ser considerado responsável pela ausência virtualmente completa do haplótipo A no Lago do Pedalinho, presente anteriormente na população ancestral. Por outro lado, a presença de vários haplótipos, respondendo pela elevada diversidade haplotípica dessa população, dá indícios de expansão populacional ou de interferência do homem na composição faunística daquela área. Esta interferência poderia ter ocorrido através da transposição de peixes de um sistema de rios para outro, levando à mistura de diferentes tipos haplotípicos, bem como da retirada de toda a vegetação natural extremamente necessária, implicando em grandes alterações ambientais sobre as comunidades dos córregos ou riachos.

Algum erro de identificação taxonômica, no entanto, não pode ser descartado, tendo em vista a ocorrência de outras espécies morfologicamente muito semelhantes a *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO, informação pessoal). Porém, as árvores filogenéticas de *neighbor-joining* e máxima verossimilhança evidenciam que os indivíduos aqui analisados estão agrupados em um único clado, reforçando a idéia de tratar-se de uma mesma espécie.

Segundo CASTRO (1999), populações de cabeceiras apresentam um maior grau de isolamento ecológico, adaptativo e geográfico. É sabido que com o passar do tempo, as populações isoladas divergem umas das outras, perdendo heterozigose e expondo seus genes deletérios, mas se houver tempo suficiente a própria seleção natural se encarrega de "purificar" a população destes genes, evitando que sejam extintas. SLATKIN (1987) afirma que a troca de poucos indivíduos entre populações seria suficiente para evitar o acúmulo de deriva genética significativa entre locais geograficamente distantes.

Os riachos da região de Campos do Jordão parecem passar por constantes modificações ambientais, tais como épocas de cheias, de secas e alterações nas condições químicas da água, bem por como modificações geológicas, refletindo em variações nas populações que habitam as cabeceiras de riachos ali encontradas. A ocorrência de fenômenos, como a captura de cabeceiras e chuvas orográficas, muito comuns naquela região, atua no sentido de alterar a pressão de seleção em cada uma dessas populações isoladas nas cabeceiras, podendo até, ocasionalmente, colocar em contato populações que se encontravam separadas (WINTERBOURN & TOWNSEND, 1998).

Então, provavelmente é esse dinamismo geográfico e ecológico que impede que essas populações desapareçam, permitindo que desenvolvam meios adaptativos para resistirem às intempéries dos ambientes mais variados em que vivem. MATTHEWS (1998) afirma que espécies de peixes que persistem em ambientes severos e sobrevivem a tanta aridez no tempo geológico ou evolutivo, é provável que já tenham passado através de um "filtro evolutivo" com adaptações de história de vida para sobreviverem nestes ambientes.

A diversidade haplotípica encontrada no presente trabalho, juntamente com a variabilidade cromossômica já descrita na literatura, podem ser resultados da fragmentação ocasionada pelo soerguimento da Serra da Mantiqueira, seguido do efeito fundador, pois cada subpopulação, provavelmente, era constituída por um pequeno número de indivíduos. O impacto geral do efeito fundador é que os alelos carregados pelos indivíduos fundadores rapidamente se tornam freqüentes na população, bem como nas gerações subseqüentes (TEMPLETON, 2003). Isoladas, essas populações podem estar sujeitas a sucessivos efeitos de *bottlenecks*, pois as variações nas condições ambientais (como períodos de seca e de cheia, por exemplo) podem causar mudanças no tamanho populacional, alterando as freqüências alélicas e conseqüentemente a variação genética nestas populações.

Ao se comparar toda a variação haplotípica encontrada no presente trabalho com a variação cromossômica apresentada por esta espécie da região de Campos do Jordão, pode-se observar que não há relação evolutiva entre o cromossomo B e o gene mitocondrial citocromo b, ou seja, a evolução de um não implica na evolução do outro. Isso é possível de se afirmar, pois populações com alta variabilidade de B não apresentaram, necessariamente, alta variabilidade haplotípica. E o inverso também não ocorreu.

As análises filogenéticas de *neighbor-joining* e máxima verossimilhança considerando as seqüências de citocromo b de *A. fasciatus* e de *A. scabripinnis* mostraram uma separação bastante evidente entre estas duas espécies. *A. fasciatus* pode ser encontrada em cavernas e nas águas de superfície do México e é uma das únicas espécies neotropicais capaz de chegar até a América do Norte (STRECKER,

BERNATCHEZ & WILKENS, 2003). Isto só é possível, porque são capazes de utilizar águas marinhas rasas para sua dispersão (MYERS, 1966).

Diferentemente do padrão filogenético encontrado para as populações de *A. scabripinnis* analisadas, o qual não pôde ser resolvido no presente trabalho, *A. fasciatus* mostrou ser uma espécie formada por diferentes linhagens gênicas, podendo até se constituir em um “complexo de espécies”. STRECKER, FAÚNDEZ & WILKENS (2004) já haviam reportado sete diferentes linhagens de DNAm_t em *A. fasciatus* ocorrendo em diferentes regiões do México, Guatemala e Belize. Trabalhos futuros utilizando indivíduos de *A. scabripinnis* de mais localidades, bem como um número maior de indivíduos por região, poderão inferir melhor quanto à estruturação filogenética desta espécie e, da mesma forma que em *A. fasciatus*, corroborar a ocorrência de um “complexo de espécie”, já mencionado em resultados citogenéticos (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991).

Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho refletem uma pequena parte da história evolutiva pela qual as populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão passaram. Não é tarefa fácil inferir a história das espécies a partir de genealogias gênicas, pois muitos eventos podem ter acontecido no passado, como expansão populacional, *bottleneck*, vicariância e migração, e linhagens gênicas podem ter sido perdidas pelo acaso (KNOWLES & MADDISON, 2002). Estudos futuros, utilizando um número maior de indivíduos por população, bem como um maior número de populações, poderão permitir a realização de uma *nested clade analysis* (TEMPLETON *et al.*, 1995) que possibilite relacionar as informações espaciais (geográficas) com os prováveis eventos que as estabeleceram. A utilização de marcadores moleculares com taxa evolutiva mais rápida, como por

exemplo, a região controladora do DNA mitocondrial (D-loop), poderá inferir sobre padrões mais recentes de evolução deste grupo de peixes para a detecção de uma história evolutiva mais atual. O uso de marcadores microssatélites também permitirá inferir com mais segurança quanto à ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão. STRECKER, BERNATCHEZ & WILKENS (2003) observaram que esses marcadores além de oferecerem um esclarecimento quanto às relações entre populações, são mais confiáveis na interpretação de padrões de fluxo gênico do que dados de DNA mitocondrial.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, a partir do seqüenciamento de parte do gene citocromo b do DNA mitocondrial de populações de *Astyanax scabripinnis* de riachos da região de Campos do Jordão, conclui-se que:

1. A ocorrência do haplótipo A em 2 populações pertencentes à bacia do Sapucaí-Guaçu e em exemplares da bacia do Paraíba do Sul, ambas separadas pela Serra da Mantiqueira, corrobora a hipótese de que essas populações estiveram em contato antes do soerguimento da Serra.
2. A ocorrência de haplótipos exclusivos e, provavelmente mais recentes, evidencia o isolamento geográfico dessas populações, já inferido por estudos citogenéticos, ou a alteração da história evolutiva deste grupo de peixe pela ação do homem.
3. A população do Lago do Pedalinho apresentou a maior diversidade haplotípica, haplótipos exclusivos e ausência do haplótipo ancestral, além de indivíduos de tamanho significativamente maior que os das demais populações. Tais ocorrências podem estar refletindo resultados de efeito fundador, *bottleneck* e/ou de ações antrópicas, pois o Lago do Pedalinho é um local situado em uma região urbanizada de Campos do Jordão e totalmente alterado pela ação humana.

4. Não há relação evolutiva entre o cromossomo B e o gene mitocondrial citocromo b, ou seja, a evolução de um não implica na evolução do outro. Isso é possível de se afirmar, pois populações com alta variabilidade de B não apresentou, necessariamente, alta variabilidade molecular. E o inverso também não ocorreu.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L. D. S. (2001). **A variabilidade do complexo de espécies *scabripinnis* (Pisces, Characidae) como estratégia adaptativa. Estudo da diversidade cariotípica do grupo com ênfase em populações da bacia do rio São Francisco.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 104pp.
- ALJANABI, S. M. & MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucleic Acids Research**, 25(22): 4692-4693.
- APOSTOLIDIS, A. P.; TRIANTAPHYLLIDIS, C. A.; KOUVATSI, P.; ECONOMIDIS, S. (1997). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L (Greek brown trout) population. **Molecular Ecology**, 6 (6): 531-542.
- ARIAS, M. C.; & INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In Matioli, S. R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 143-152.
- ATTARDI, G. (1985). Animal mitochondrial DNA: na extreme example of genetics economy. **International Review of Cytology.** 93: 93-145.
- AVISE, J. C. & SELANDER, R. K. (1972). Genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. **Evolution** 26: 1-19.
- AVISE, J. C.; LANSMAN, R. A.; SHADE, R. O. (1979). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics** 92: 279-295.

- AVISE, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London B.** 312: 325-342.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M. Jr.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A. & SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics.** 18: 489-522.
- AVISE, J. C.; BALL, R. M. Jr. & ARNOLD, J. (1988). Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. **Molecular Biology Evolution.** 5: 331-344.
- AVISE, J. C. (2000). **Phylogeography: the history and formation of species.** Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts London, England.
- BAIRD, S. F. & GIRARD C. F. (1854). Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U. S. A. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.** 7: 24-29.
- BERMINGHAM E.; LAMB, T. & AVISE J. C. (1986). Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **Journal of Heredity.** 77: 249-252.
- BOORE, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research.** 27: 1767-1780.

- BRIOLAY, J.; GALTIER, N.; BRITO, R. M. & BOUVET, Y. (1998). Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 9 (1): 100-108.
- BRITSKI, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo – sistemática. In: **Poluição e Psicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, p. 79-108.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y. & ROSA, A. B. S. (1988). **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. 3. ed. Brasília: Câmaras dos Deputados/ CODEVASP, 115p.
- BRITSKI H. A.; SILIMON, K. Z. S. & LOPES, B. S. (1999). **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 184p.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M, Jr. & WILSON, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 76: 1967-1971.
- BUCKUP, P. A. (1999). Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de peixes de riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, VI, pp. 91-138.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. & DE SALLE, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 36: 135-153.
- CANTATORE, P. & SACCONI, C. (1987). Organization, structure and evolution of mammalian mitochondrial genes. **International Review of Cytology**. 108: 149-208.

- CARAMASCHI, E. P. (1986). **Estudos da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu – SP)**. Tese de doutorado. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. 245 pp.
- CASTRO, R. M. C. (1999). Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de peixes de riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, VI, pp. 139-155.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. & EDWARDS, A. W. F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. The **American Journal of Human Genetics**. 18: 233-257.
- CHROMAS versão 2.23 (TECHNELYSIUM 1998 – 2000).
<http://www.technelysium.com.au>
- CLARK-WALKER, G. D. (1985). Basis of diversity in mitochondrial DNAs. In: CAVALIER- SMITH, T. (Ed.). **Evolution of Genome Size**. Wiley, New York, pp. 277-297.
- CLEMENT, M.; POSADA, D & CRANDALL, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**. 9(10): 1657-1660.
- DOADRIO, I.; CARMONA, J. A. & MACHORDOM, A. (2002). Haplotype diversity and phylogenetic relationships among the Iberian barbels (*Barbus*, Cyprinidae) reveal two evolutionary lineages. **The American Genetic Association**. 93: 140-147.

- DOWLING, T. E., MARTASIAN, D. P. & JEFFERY, W. R. (2002). Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Molecular Biology and Evolution**.19: 446-455.
- EIGENMANN C. H. (1921). The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, Cambridge. v. 23, p. 209-310,
- FARIAS, I. P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. & MEYER, A. (1999). Mitochondrial DNA Phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical Assemblage. **Journal of Molecular Evolution**. 48: 703-711.
- FARIAS, I. P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. & MEYER, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among Cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**. 53: 89-103.
- FAUAZ, G.; VICENTE, V. E. & MOREIRA-FILHO, O. (1994). Natural triploidy and B chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Revista Brasileira de Genética**. 17(2): 157-163.
- FELSENSTEIN, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**. 17: 369-376.
- FERRO D. A. M. (2000). **Análises cariotípicas e dos cromossomos B em populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 98 pp.
- FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces,

- Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genética**. 110: 55-62.
- FINK, S. V. & FINK, W. L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**. 72(4): 297-353.
- FOWLER, H. W. (1948). Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivo de Zoologia do Estado de São Paulo**. 6: 1-204.
- GARCIA-MACHADO, E.; DENNEBOUY, N.; SUAREZ, M. O.; MOUNOLOU, J. C. & MONNFROT, M. (1996). Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. Paris. 319-486.
- GARESSE, R. & VALLEJO, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. **Gene** 263: 1-16.
- GARUTTI, V. (1988). Distribuição longitudinal da ictiofauna de um córrego na região noroeste do Estado de São Paulo. Bacia do Rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**. 48: 747-759.
- GÉRY, J. (1977). **Characoids of the world**. New Jersey: T. F. H. Publications. 672 pp.
- GODOY, M. P. (1975). **Peixes do Brasil, subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi-Guassu**. Piracicaba: Franciscana. (1): 216pp.
- GOMES, A. L. & AZEVEDO, P. (1960). Os peixes de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia**. Vol 14(16): 133-151.

- GRAY, M. W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. **Annual Review of Cell Biology**. 5: 25-50.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95-98.
- HALSBERGHE, M. J. E. (2006). **Análise filogeográfica da variação genética intraespecífica do cavalo-marinho *Hippicampus reidi* ao longo da costa brasileira**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 69 pp.
- HARTL, D. L. & CLARK, A. G. (1989). **Principles of population genetics**. 2^a ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- HUDSON, R. R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process. In: FUTUYMA, D. J. & ANTONOVICS, J. D. (Ed.). **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**. Oxford University Press, New York.
- IGUCHI, K.; WATANABE, K. & NISHIDA, M. (1999). Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. **Aquaculture**. 178: 235-243.
- KING, L. C. (1956). A geomorfologia do Brasil oriental. **Revista Brasileira de Geografia**. XVIII, 2: 147-256.
- KNOWLES, L. L. & MADDISON, W. P. (2002). Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**. 11: 2623-2635.
- LANGGANI-NETO, F. (1989). **Ictiofauna do alto curso do Rio Tietê (SP): Taxonomia**. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da USP, São Paulo.

- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C. & LUCINDA, P. H. F. (2003). Characidae. In: REIS, R. E. KULLANDER, S. O. & FERRARIS Jr., C. J. **Chek list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 104-169.
- LIS, J. T. (1980). Fractionation of DNA fragments by polyethyleneglycol induced precipitation. **Methods in Enzymology**. 65: 347-353.
- LOWE-McCONNEL, R. H. (1969). Speciation in tropical freshwater fishes. In: LOWE-McCONNEL, R. (Ed.). **Speciation in tropical environments**. London: Academic Press. pp. 51-75. (Biological Journal of the Linnean Society, 1).
- LOWE-McCONNELL, R. H. (1999). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo. EDUSP. pp. 534.
- LYDEARD, C. & ROE, K. J. (1997). The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In: KOSHER, T. D. & STEPIEN, C. A. (Eds). **Molecular Systematics of Fishes**. Academic Press, San Diego, California.
- MAISTRO, E. L.; DIAS, A. L.; FORESTIS, F.; OLIVEIRA, C. & MOREIRA-FILHO, O. (1994a). Natural Triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and Simultaneous occurrence of Macro B-Chromosomes. **Caryologia**. 47: 233-239.
- MAISTRO, E. L.; DIAS, A. L.; FORESTIS, F. & OLIVEIRA, C. (1994b). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae). **Brasilian Journal of Genetics**. 17: 153-156.

- MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. 21(2): 201-206.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A. & MOREIRA-FILHO, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genética**. 109: 161-168.
- MARTINS, N. S.; OLIVEIRA, M. A.; WALDRIGUES, A.; GIULIANO, L. & ARAUJO, A. M. L. V. (1984). Estudo cariotípico de *Astyanax scabripinnis paranae* da região de Londrina, PR. **Ciência e Cultura**. 36: 862-863.
- MARTONE, E. (1940). Problèmes morphologiques du Brésil tropical atlantique. In: MODENESI, M. C. (1988). **Significado dos depósitos correlativos quaternários em Campos do Jordão – São Paulo: implicações paleoclimáticas e paleoecológicas**. Instituto geológico – Boletim nº 7. pp. 155.
- MATEOS, M.; SANJUR, O. & VRIJENHOEK, R. C. (2002). Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). **Evolution**. 56(5): 972-984.
- MATIOLI, S. R. (2004). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. pp. 202.
- MATTHEWS, W. J. (1998). **Patterns in freshwater fisher ecology**. New York: Chapman & Hall, 756 p.

- MELAND, S.; JOHANSEN, S.; JOHANSEN, T.; *et al.* (1991). Rapid disappearance of one parental mitochondrial genotype after isogamous mating in the myxomycete *Physarum polycephalum*. **Current Genetics**. 19: 55-60.
- MENEZES, N. A. (1992). Sistemática de peixes. In: AGOSTINHO, A. A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. **Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá: EDUEM, pp 18-28.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI Jr.; P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. S.; MOREIRA-FILHO, O. & CAMACHO, J. P. M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**. 85: 1-9.
- MEYER A. (1994). DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A. R. (Ed.). **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. London, pp. 219-249.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N. & MARTINS-SANTOS, I. C. (1998). Cytogenetic and morphometric differences in population of *Astyanax scabripinnis* (Pices, Characidae) from Maringa region, Pr, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. 21: 55-61.
- MODENESI, M. C. (1988). **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.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**. 14: 331-357.

- MOREIRA-FILHO, O. (1989). **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no "complexo" *Astyanax scabripinnis* (Jenys, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae).** Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP. 135pp.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**. 36: 245-250.
- MORITZ, C.; DOWLING, T. E. & BROWN, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**.18: 269-292.
- MOYSÉS, C. B. & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2002). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. 25(4): 401-404.
- MUNIN, F. S.; SCHWANTES, M. L.; SCHWANTES, A. R. & MOREIRA-FILHO, O. (2004). NADP-dependent isocitrate dehydrogenase of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from three altitudes at Grande Stream, Campos do Jordão, SP. **Brazilian Journal of Biology**. 64(2): 273-282.
- MYERS, G. S. (1966). Derivation of the freshwater fish fauna of Central América. **Copeia** 4: 766–773.
- NAHUM, L. A. (2004). Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 82-96.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C. & PAVANELLI, C. S. (2001). **Ovos e larvas de peixes de**

- água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá, EDUEM. 378p.
- NEI, M. (1986). Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. In: GERSHOWITZ; RUCKNAGEL, D. L.; TASHIAN, R. E. (Eds.). **Evolutionary perspectives and the new genetics.** Alan R. Inc. Press, pp. 133-147.
- NEI, M. (1987). **Molecular evolutionary genetics.** Columbia University Press, New York.
- NEI, M & KUMAR, S. (2000). **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press, New York. 333p.
- NELSON, J. S. (1994). **Fishes of the World.** 3. ed. New York: John Willey, 600 p.
- NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O. & CAMACHO, J. P. (2000a). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity.** 85: 136-141.
- NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. (2000b). Morphological differentiation and possible origin of B chromosome in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genética.** 108: 211-215.
- ORTI, G. & MEYER, A. (1997). The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology.** 46(1): 75-100.
- PALUMBI, S.; MARTINS, A.; ROMANO, S.; McMILLAN, W. O.; STICE, L. & GRABOWSKI, G. (2002). **The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.** University of Hawaii.

- PELIÇÃO-DARDIS, G. C. (2006). **Análise filogeográfica de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes, Characidae) da bacia do Alto rio Paraná no estado de São Paulo.** Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. pp. 134.
- PERDICER, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A. & DOADRIO, I. (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 25: 172-189.
- PERLER, F.; EFSTRATIADIS, A.; LOMEDICO, P.; GILBERT, W.; KOLODNER, R. & DODGSON, J. (1980). The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene. **Cell.** 20: 555-556.
- POSADA, D & CRANDALL, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics Applications Note.** 14: 817-818.
- POSADA, D & CRANDALL, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution.** 16(1): 37-45.
- PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr., H. F.; PAVANELI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M. & PRIOLI, L. M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguacu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology.** 25(4): 421-430.
- REIS, R. E. (2003). Subfamily Tetragonopterinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; Ferraris JR., C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 212.

- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X. & ROZAS, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. 19: 2496-2497.
- RUELLAN, F. (1952). Excursão à região do Vale do Paraíba e à Serra da Mantiqueira. Guia da excursão B I Reunião Pan – Americana de Consulta sobre Geografia. Set. 1949. Anais 2: 206-251. In: In: MODENESI, M. C. (1988). **Significado dos depósitos correlativos quaternários em Campos do Jordão – São Paulo: implicações paleoclimáticas e paleoecológicas**. Instituto geológico – Boletim nº 7. pp. 155.
- RUSSO, C. A. M. (2004). Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 130-136.
- SACCONE, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G. & REYES, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**. 238: 195-209.
- SAITOU, N. & IMANISHI, T. (1989). Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. **Molecular Biology and Evolution**. 6: 514-525.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 4: 406-425.
- SCHNEIDER, H. (2003). **Métodos de análise filogenética**. Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 114p.

- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E. & ORTÍ, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**. 10: 407-417.
- SLATKIN, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**. 236: 787-792.
- SNYDER, M.; FRASER, A. R.; LaROCHE, J.; GARTNER-KEPKAY, K. E. & ZOUROS, E. (1987). Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 84: 7595-7599.
- SOUZA, I. L. & MOREIRA-FILHO, O. (1995). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex. II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia**. 60: 273-281.
- SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (1995). Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. **Cytobios**. 83: 273-281.
- SOUZA, I. L.; GALIÁN, J.; DE LA RÚA, P.; BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. (2001). Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**. 66: 85-91.
- STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L. & WILKENS, H. (2003). Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**. 12: 699-710.
- STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V. H. & WILKENS, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on

- cytochrome b sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 33: 469-481.
- SWOFFORD, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others methods). Versão 4. **Sinauer Associates**. Sunderland, Massachusetts.
- TEMPLETON, A.; ROUTMAN, E. & PHILLIPS, C. (1995). Separating population structure from population history: a cladística analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**. 140: 767-782.
- TEMPLETON, A. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**. 7: 381-397.
- TEMPLETON, A. (2003). **Population genetics and microevolutionary theory**. To be published by Wiley & Sons.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22(22): 4673-4680.
- TRAVASSOS, H. & SANTOS, R. S. (1955). **Caracídeos fósseis da bacia do Paraíba**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, D. F. e divisão de Geologia e Mineralogia do Departamento Nacional de Produção Mineral, R.J., D.F.
- VICENTE, M. R. R. & GALETTI JUNIOR, P. M. (1994). Caracterização cromossômica de *Astyanax scabripinnis* do Rio Pequeno (Bacia do Paraíba do Sul). **V Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Resumos**. 55p. Botucatu

- VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. CAMACHO, J. P. M. (1996). Sex-ratio distortion associated to the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**. 74: 70-75.
- WALLACE, D. C. (1995). Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. **American Journal of Human Genetics**. 57(2): 201-223.
- WINTERBOURN, M. J. & TOWNSEND, C. R. (1998). Streams and rivers: one-way flow systems. In: BARNES, R. S. K. & MANN, K. H. **Fundamental of aquatic ecology**. Oxford: Blackwell Sci. pp. 230-242.
- ZARDOYA, R. & DOADRIO, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. **Journal of Molecular Evolution**. 49: 227-237.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Alinhamento das sequencias de parte do gene citocromo b em *Astyanax scabripinnis*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
24_V_INGL	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
26_V_INGL	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
27_V_INGL	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
28_V_INGL	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
04_V_INGL	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
104_RBFOJO	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
102_RBFOJO	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
101_RBFOJO	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACAGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
103_RBFOJO	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACAGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
53_RIB_PQ	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
51_RIB_PQ	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
52_RIB_PQ	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
55_RIB_PQ	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
54_RIB_PQ	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACC	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
203_GAVEA	TCTCTGCCAG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
204_GAVEA	TCTCTGCCAG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
205_GAVEA	TCTCTGCCAG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
153_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATCAATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
157_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATCAATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
156_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
154_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACAGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
152_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACC	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
155_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ATACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
151_CAPIV	ACTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ATACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
352_RB_GR	TCTCTGCCCTG	ATTATACAAA	TCCTCACCGG	ATTATTCCCTA	GCCATACACT	ACACCTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CTGTAGCCCA	CATCTGTCTGA
A_mexicanu	CCTATGCCCTA	ATAATACAAA	TTTTTAACCGG	ACTATTCCCTA	GCTATACACT	ACACTTCTGA	TATTTCAACA	GCTTTCTCTT	CCGTAGCCCA	TATCTGCCCA

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
24_V_INGL	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG
26_V_INGL	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG
27_V_INGL	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG
28_V_INGL	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG
04_V_INGL	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG
104_RBFOJO	GATGTAACCT	ATGGATGGAT	TATCCGAAAC	ATACATGCTA	ACGGAGCATC	ATTCITTTTTT	ATCTGTATCT	ACCTACACAT	TGGCCGAGGC	CTCTACTACG

154_CAPIV ACTCGCATCA CTAGCCCTAT TCTCCCCCAA TCTCCTAGGG GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT
152_CAPIV ACTCGCATCA CTAGCCCTAT TCTCCCCCAA TCTCCTAGGG GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT
155_CAPIV ACTCGCATCA CTAGCCCTAT TCTCCCCCAA TCTCCTAGGG GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT
151_CAPIV ACTCGCATCA CTAGCCCTAT TCTCCCCCAA TCTCCTAGGG GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT
352_RB_GR ACTCGCATCA CTAGCCCTAT TCTCCCCCAA TCTCCTAGGG GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT
A_mexicanu ACTAAGGTC TTAGCCTTAT TCTCCCCCAA CCTCCTAGGA GACCCAGAAA ACTTACACC TGCCAACCCA CTTGTTACAC CACCCCAT

24_V_01
25_V_02
26_V_03
27_V_04
28_V_05
29_V_06
30_V_07
31_V_08
32_V_09
33_V_10
34_V_11
35_V_12
36_V_13
37_V_14
38_V_15
39_V_16
40_V_17
41_V_18
42_V_19
43_V_20
44_V_21
45_V_22
46_V_23
47_V_24
48_V_25
49_V_26
50_V_27
51_V_28
52_V_29
53_V_30
54_V_31
55_V_32
56_V_33
57_V_34
58_V_35
59_V_36
60_V_37
61_V_38
62_V_39
63_V_40
64_V_41
65_V_42
66_V_43
67_V_44
68_V_45
69_V_46
70_V_47
71_V_48
72_V_49
73_V_50
74_V_51
75_V_52
76_V_53
77_V_54
78_V_55
79_V_56
80_V_57
81_V_58
82_V_59
83_V_60
84_V_61
85_V_62
86_V_63
87_V_64
88_V_65
89_V_66
90_V_67
91_V_68
92_V_69
93_V_70
94_V_71
95_V_72
96_V_73
97_V_74
98_V_75
99_V_76
100_V_77
101_V_78
102_V_79
103_V_80
104_V_81
105_V_82
106_V_83
107_V_84
108_V_85
109_V_86
110_V_87
111_V_88
112_V_89
113_V_90
114_V_91
115_V_92
116_V_93
117_V_94
118_V_95
119_V_96
120_V_97
121_V_98
122_V_99
123_V_100
124_V_101
125_V_102
126_V_103
127_V_104
128_V_105
129_V_106
130_V_107
131_V_108
132_V_109
133_V_110
134_V_111
135_V_112
136_V_113
137_V_114
138_V_115
139_V_116
140_V_117
141_V_118
142_V_119
143_V_120
144_V_121
145_V_122
146_V_123
147_V_124
148_V_125
149_V_126
150_V_127
151_V_128
152_V_129
153_V_130
154_V_131
155_V_132
156_V_133
157_V_134
158_V_135
159_V_136
160_V_137
161_V_138
162_V_139
163_V_140
164_V_141
165_V_142
166_V_143
167_V_144
168_V_145
169_V_146
170_V_147
171_V_148
172_V_149
173_V_150
174_V_151
175_V_152
176_V_153
177_V_154
178_V_155
179_V_156
180_V_157
181_V_158
182_V_159
183_V_160
184_V_161
185_V_162
186_V_163
187_V_164
188_V_165
189_V_166
190_V_167
191_V_168
192_V_169
193_V_170
194_V_171
195_V_172
196_V_173
197_V_174
198_V_175
199_V_176
200_V_177
201_V_178
202_V_179
203_V_180
204_V_181
205_V_182
206_V_183
207_V_184
208_V_185
209_V_186
210_V_187
211_V_188
212_V_189
213_V_190
214_V_191
215_V_192
216_V_193
217_V_194
218_V_195
219_V_196
220_V_197
221_V_198
222_V_199
223_V_200
224_V_201
225_V_202
226_V_203
227_V_204
228_V_205
229_V_206
230_V_207
231_V_208
232_V_209
233_V_210
234_V_211
235_V_212
236_V_213
237_V_214
238_V_215
239_V_216
240_V_217
241_V_218
242_V_219
243_V_220
244_V_221
245_V_222
246_V_223
247_V_224
248_V_225
249_V_226
250_V_227
251_V_228
252_V_229
253_V_230
254_V_231
255_V_232
256_V_233
257_V_234
258_V_235
259_V_236
260_V_237
261_V_238
262_V_239
263_V_240
264_V_241
265_V_242
266_V_243
267_V_244
268_V_245
269_V_246
270_V_247
271_V_248
272_V_249
273_V_250
274_V_251
275_V_252
276_V_253
277_V_254
278_V_255
279_V_256
280_V_257
281_V_258
282_V_259
283_V_260
284_V_261
285_V_262
286_V_263
287_V_264
288_V_265
289_V_266
290_V_267
291_V_268
292_V_269
293_V_270
294_V_271
295_V_272
296_V_273
297_V_274
298_V_275
299_V_276
300_V_277
301_V_278
302_V_279
303_V_280
304_V_281
305_V_282
306_V_283
307_V_284
308_V_285
309_V_286
310_V_287
311_V_288
312_V_289
313_V_290
314_V_291
315_V_292
316_V_293
317_V_294
318_V_295
319_V_296
320_V_297
321_V_298
322_V_299
323_V_300
324_V_301
325_V_302
326_V_303
327_V_304
328_V_305
329_V_306
330_V_307
331_V_308
332_V_309
333_V_310
334_V_311
335_V_312
336_V_313
337_V_314
338_V_315
339_V_316
340_V_317
341_V_318
342_V_319
343_V_320
344_V_321
345_V_322
346_V_323
347_V_324
348_V_325
349_V_326
350_V_327
351_V_328
352_V_329
353_V_330
354_V_331
355_V_332
356_V_333
357_V_334
358_V_335
359_V_336
360_V_337
361_V_338
362_V_339
363_V_340
364_V_341
365_V_342
366_V_343
367_V_344
368_V_345
369_V_346
370_V_347
371_V_348
372_V_349
373_V_350
374_V_351
375_V_352
376_V_353
377_V_354
378_V_355
379_V_356
380_V_357
381_V_358
382_V_359
383_V_360
384_V_361
385_V_362
386_V_363
387_V_364
388_V_365
389_V_366
390_V_367
391_V_368
392_V_369
393_V_370
394_V_371
395_V_372
396_V_373
397_V_374
398_V_375
399_V_376
400_V_377
401_V_378
402_V_379
403_V_380
404_V_381
405_V_382
406_V_383
407_V_384
408_V_385
409_V_386
410_V_387
411_V_388
412_V_389
413_V_390
414_V_391
415_V_392
416_V_393
417_V_394
418_V_395
419_V_396
420_V_397
421_V_398
422_V_399
423_V_400
424_V_401
425_V_402
426_V_403
427_V_404
428_V_405
429_V_406
430_V_407
431_V_408
432_V_409
433_V_410
434_V_411
435_V_412
436_V_413
437_V_414
438_V_415
439_V_416
440_V_417
441_V_418
442_V_419
443_V_420
444_V_421
445_V_422
446_V_423
447_V_424
448_V_425
449_V_426
450_V_427
451_V_428
452_V_429
453_V_430
454_V_431
455_V_432
456_V_433
457_V_434
458_V_435
459_V_436
460_V_437
461_V_438
462_V_439
463_V_440
464_V_441
465_V_442
466_V_443
467_V_444
468_V_445
469_V_446
470_V_447
471_V_448
472_V_449
473_V_450
474_V_451
475_V_452
476_V_453
477_V_454
478_V_455
479_V_456
480_V_457
481_V_458
482_V_459
483_V_460
484_V_461
485_V_462
486_V_463
487_V_464
488_V_465
489_V_466
490_V_467
491_V_468
492_V_469
493_V_470
494_V_471
495_V_472
496_V_473
497_V_474
498_V_475
499_V_476
500_V_477
501_V_478
502_V_479
503_V_480
504_V_481
505_V_482
506_V_483
507_V_484
508_V_485
509_V_486
510_V_487
511_V_488
512_V_489
513_V_490
514_V_491
515_V_492
516_V_493
517_V_494
518_V_495
519_V_496
520_V_497
521_V_498
522_V_499
523_V_500
524_V_501
525_V_502
526_V_503
527_V_504
528_V_505
529_V_506
530_V_507
531_V_508
532_V_509
533_V_510
534_V_511
535_V_512
536_V_513
537_V_514
538_V_515
539_V_516
540_V_517
541_V_518
542_V_519
543_V_520
544_V_521
545_V_522
546_V_523
547_V_524
548_V_525
549_V_526
550_V_527
551_V_528
552_V_529
553_V_530
554_V_531
555_V_532
556_V_533
557_V_534
558_V_535
559_V_536
560_V_537
561_V_538
562_V_539
563_V_540
564_V_541
565_V_542
566_V_543
567_V_544
568_V_545
569_V_546
570_V_547
571_V_548
572_V_549
573_V_550
574_V_551
575_V_552
576_V_553
577_V_554
578_V_555
579_V_556
580_V_557
581_V_558
582_V_559
583_V_560
584_V_561
585_V_562
586_V_563
587_V_564
588_V_565
589_V_566
590_V_567
591_V_568
592_V_569
593_V_570
594_V_571
595_V_572
596_V_573
597_V_574
598_V_575
599_V_576
600_V_577
601_V_578
602_V_579
603_V_580
604_V_581
605_V_582
606_V_583
607_V_584
608_V_585
609_V_586
610_V_587
611_V_588
612_V_589
613_V_590
614_V_591
615_V_592
616_V_593
617_V_594
618_V_595
619_V_596
620_V_597
621_V_598
622_V_599
623_V_600
624_V_601
625_V_602
626_V_603
627_V_604
628_V_605
629_V_606
630_V_607
631_V_608
632_V_609
633_V_610
634_V_611
635_V_612
636_V_613
637_V_614
638_V_615
639_V_616
640_V_617
641_V_618
642_V_619
643_V_620
644_V_621
645_V_622
646_V_623
647_V_624
648_V_625
649_V_626
650_V_627
651_V_628
652_V_629
653_V_630
654_V_631
655_V_632
656_V_633
657_V_634
658_V_635
659_V_636
660_V_637
661_V_638
662_V_639
663_V_640
664_V_641
665_V_642
666_V_643
667_V_644
668_V_645
669_V_646
670_V_647
671_V_648
672_V_649
673_V_650
674_V_651
675_V_652
676_V_653
677_V_654
678_V_655
679_V_656
680_V_657
681_V_658
682_V_659
683_V_660
684_V_661
685_V_662
686_V_663
687_V_664
688_V_665
689_V_666
690_V_667
691_V_668
692_V_669
693_V_670
694_V_671
695_V_672
696_V_673
697_V_674
698_V_675
699_V_676
700_V_677
701_V_678
702_V_679
703_V_680
704_V_681
705_V_682
706_V_683
707_V_684
708_V_685
709_V_686
710_V_687
711_V_688
712_V_689
713_V_690
714_V_691
715_V_692
716_V_693
717_V_694
718_V_695
719_V_696
720_V_697
721_V_698
722_V_699
723_V_700
724_V_701
725_V_702
726_V_703
727_V_704
728_V_705
729_V_706
730_V_707
731_V_708
732_V_709
733_V_710
734_V_711
735_V_712
736_V_713
737_V_714
738_V_715
739_V_716
740_V_717
741_V_718
742_V_719
743_V_720
744_V_721
745_V_722
746_V_723
747_V_724
748_V_725
749_V_726
750_V_727
751_V_728
752_V_729
753_V_730
754_V_731
755_V_732
756_V_733
757_V_734
758_V_735
759_V_736
760_V_737
761_V_738
762_V_739
763_V_740
764_V_741
765_V_742
766_V_743
767_V_744
768_V_745
769_V_746
770_V_747
771_V_748
772_V_749
773_V_750
774_V_751
775_V_752
776_V_753
777_V_754
778_V_755
779_V_756
780_V_757
781_V_758
782_V_759
783_V_760
784_V_761
785_V_762
786_V_763
787_V_764
788_V_765
789_V_766
790_V_767
791_V_768
792_V_769
793_V_770
794_V_771
795_V_772
796_V_773
797_V_774
798_V_775
799_V_776
800_V_777
801_V_778
802_V_779
803_V_780
804_V_781
805_V_782
806_V_783
807_V_784
808_V_785
809_V_786
810_V_787
811_V_788
812_V_789
813_V_790
814_V_791
815_V_792
816_V_793
817_V_794
818_V_795
819_V_796
820_V_797
821_V_798
822_V_799
823_V_800
824_V_801
825_V_802
826_V_803
827_V_804
828_V_805
829_V_806
830_V_807
831_V_808
832_V_809
833_V_810
834_V_811
835_V_812
836_V_813
837_V_814
838_V_815
839_V_816
840_V_817
841_V_818
842_V_819
843_V_820
844_V_821
845_V_822
846_V_823
847_V_824
848_V_825
849_V_826
850_V_827
851_V_828
852_V_829
853_V_830
854_V_831
855_V_832
856_V_833
857_V_834
858_V_835
859_V_836
860_V_837
861_V_838
862_V_839
863_V_840
864_V_841
865_V_842
866_V_843
867_V_844
868_V_845
869_V_846
870_V_847
871_V_848
872_V_849
873_V_850
874_V_851
875_V_852
876_V_853
877_V_854
878_V_855
879_V_856
880_V_857
881_V_858
882_V_859
883_V_860
884_V_861
885_V_862
886_V_863
887_V_864
888_V_865
889_V_866
890_V_867
891_V_868
892_V_869
893_V_870
894_V_871
895_V_872
896_V_873
897_V_874
898_V_875
899_V_876
900_V_877
901_V_878
902_V_879
903_V_880
904_V_881
905_V_882
906_V_883
907_V_884
908_V_885
909_V_886
910_V_887
911_V_888
912_V_889
913_V_890
914_V_891
915_V_892
916_V_893
917_V_894
918_V_895
919_V_896
920_V_897
921_V_898
922_V_899
923_V_900
924_V_901
925_V_902
926_V_903
927_V_904
928_V_905
929_V_906
930_V_907
931_V_908
932_V_909
933_V_910
934_V_911
935_V_912
936_V_913
937_V_914
938_V_915
939_V_916
940_V_917
941_V_918
942_V_919
943_V_920
944_V_921
945_V_922
946_V_923
947_V_924
948_V_925
949_V_926
950_V_927
951_V_928
952_V_929
953_V_930
954_V_931
955_V_932
956_V_933
957_V_934
958_V_935
959_V_936
960_V_937
961_V_938
962_V_939
963_V_940
964_V_941
965_V_942
966_V_943
967_V_944
968_V_945
969_V_946
970_V_947
971_V_948
972_V_949
973_V_950
974_V_951
975_V_952
976_V_953
977_V_954
978_V_955
979_V_956
980_V_957
981_V_958
982_V_959
983_V_960
984_V_961
985_V_962
986_V_963
987_V_964
988_V_965
989_V_966
990_V_967
991_V_968
992_V_969
993_V_970
994_V_971
995_V_972
996_V_973
997_V_974
998_V_975
999_V_976
1000_V_977
1001_V_978
1002_V_979
1003_V_980
1004_V_981
1005_V_982
1006_V_983
1007_V_984
1008_V_985
1009_V_986
1010_V_987
1011_V_988
1012_V_989
1013_V_990
1014_V_991
1015_V_992
1016_V_993
1017_V_994
1018_V_995
1019_V_996
1020_V_997
1021_V_998
1022_V_999
1023_V_1000
1024_V_1001
1025_V_1002
1026_V_1003
1027_V_1004
1028_V_1005
1029_V_1006
1030_V_1007
1031_V_1008
1032_V_1009
1033_V_1010
1034_V_1011
1035_V_1012
1036_V_1013
1037_V_1014
1038_V_1015
1039_V_1016
1040_V_1017
1041_V_1018
1042_V_1019
1043_V_1020
1044_V_1021
1045_V_1022
1046_V_1023
1047_V_1024
1048_V_1025
1049_V_1026
1050_V_1027
1051_V_1028
1052_V_1029
1053_V_1030
1054_V_1031
1055_V_1032
1056_V_1033
1057_V_1034
1058_V_1035
1059_V_1036
1060_V_1037
1061_V_1038
1062_V_1039
1063_V_1040
1064_V_1041
1065_V_1042
1066_V_1043
1067_V_1044
1068_V_1045
1069_V_1046
1070_V_1047
1071_V_1048
1072_V_1049
1073_V_1050
1074_V_1051
1075_V_1052
1076_V_1053
1077_V_1054
1078_V_1055
1079_V_1056
1080_V_1057
1081_V_1058
1082_V_1059
1083_V_1060
1084_V_1061
1085_V_1062
1086_V_1063
1087_V_1064
1088_V_1065
1089_V_1066
1090_V_1067
1091_V_1068
1092_V_1069
1093_V_1070
1094_V_1071
1095_V_1072
1096_V_1073
1097_V_1074
1098_V_1075
1099_V_1076
1100_V_1077
1101_V_1078
1102_V_1079
1103_V_1080
1104_V_1081
1105_V_1082
1106_V_1083
1107_V_1084
1108_V_1085
1109_V_1086
1110_V_1087
1111_V_1088
1112_V_1089
1113_V_1090
1114_V_1091
1115_V_1092
1116_V_1093
1117_V_1094
1118_V_1095
1119_V_1096
1120_V_1097
1121_V_1098
1122_V_1099
1123_V_1100
1124_V_1101
1125_V_1102
1126_V_1103
1127_V_1104
1128_V_1105
1129_V_1106
1130_V_1107
1131_V_1108
1132_V_1109
1133_V_1110
1134_V_1111
1135_V_1112
1136_V_1113
1137_V_1114
1138_V_1115
1139_V_1116
1140_V_1117
1141_V_1118
1142_V_1119
1143_V_1120
1144_V_1121
1145_V_1122
1146_V_1123
1147_V_1124
1148_V_1125
1149_V_1126
1150_V_1127
1151_V_1128
1152_V_1129
1153_V_1130
1154_V_1131
1155_V_1132
1156_V_1133
1157_V_1134
1158_V_1135
1159_V_1136
1160_V_1137
1161_V_1138
1162_V_1139
1163_V_1140
1164_V_1141
1165_V_1142
1166_V_1143
1167_V_1144
1168_V_1145
1169_V_1146
1170_V_1147
1171_V_1148
1172_V_1149
1173_V_1150
1174_V_1151
1175_V_1152
1176_V_1153
1177_V_1154
1178_V_1155
1179_V_1156
1180_V_1157
1181_V_1158
1182_V_1159
1183_V_1160
1184_V_1161
1185_V_1162
1186_V_1163
1187_V_1164
1188_V_1165
1189_V_1166
1190_V_1167
1191_V_1168
1192_V_1169
1193_V_1170
1194_V_1171
1195_V_1172
1196_V_1173
1197_V_1174
1198_V_1175
1199_V_1176
1200_V_1177
1201_V_1178
1202_V_1179
1203_V_1180
1204_V_1181
1

ANEXO 2: Alinhamento da tradução das sequencias de parte do gene citocromo b em *Astyanax scabripinnis*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
24_V_INGL	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
26_V_INGL	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
27_V_INGL	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
28_V_INGL	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
04_V_INGL	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
104_RBFOJO	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
102_RBFOJO	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
101_RBFOJO	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
103_RBFOJO	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
53_RIB_PQ	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
51_RIB_PQ	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
52_RIB_PQ	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
55_RIB_PQ	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
54_RIB_PQ	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
203_GAVEA	LCQIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
204_GAVEA	LCQIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
205_GAVEA	LCQIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
153_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
157_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
156_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
154_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
152_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
155_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
151_CAPIV	LCLIIQILTG	LFLAIHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNIHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*NIGVV	LLLLVIITAF	VGVLV*GQM
352_RB_GR	LCLMMQILTG	LFLAMHYTSD	ISTAFSSVAH	ICRDVNYGWI	IRNMHANGAS	FFFCIYIHLHI	GRGLYYGSYL	YKET*WNI	LLLLMMTAF	VGVLV*GQM
A_mexicanu										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
24_V_INGL	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA
26_V_INGL	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA
27_V_INGL	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA
28_V_INGL	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA
04_V_INGL	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA
104_RBFOJO	SF*GATVITN	LLSAVVPYIGD	ALVQ*I*GGF	SVDNATLTRF	FAFHFLFPFV	IVAATLLHAL	FLHETGSNNP	AGLNSDSDKI	SFHPYFSYKD	LLGFILLTA

102_RBFOJO SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 101_RBFOJO SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 103_RBFOJO SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 53_RIB_PQ SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 51_RIB_PQ SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 52_RIB_PQ SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 55_RIB_PQ SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 54_RIB_PQ SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 203_GAVEA SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 204_GAVEA SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 205_GAVEA SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 153_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 157_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 156_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 154_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 152_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 155_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 151_CAPIV SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 352_RB_GR SF*GATVITN LLSAVPYIGD ALVQ*I*GGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IVAATLLHAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFILLTA
 A_mexicanu SFGATVITN LLSAVPYMGD ALVQIWGGF SVDNATLTRF FAFHFLFPFV IIAATLLQAL FLHETGSNNP AGLNSDSDKI SFHPYFSYKD LLGFIMLTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....

24_V_INGL LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 26_V_INGL LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 27_V_INGL LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 28_V_INGL LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 04_V_INGL LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 104_RBFOJO LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 102_RBFOJO LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 101_RBFOJO LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 103_RBFOJO LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 53_RIB_PQ LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 51_RIB_PQ LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 52_RIB_PQ LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 55_RIB_PQ LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 54_RIB_PQ LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 203_GAVEA LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 204_GAVEA LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
 205_GAVEA LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH

153_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
157_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
156_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
154_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
152_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
155_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
151_CAPIV LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
352_RB_GR LASLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH
A_mexi.canu LTSLALFSPN LLGDPENFTP ANPLVTPPH