

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CONSERVAÇÃO E MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL
MESTRADO

FLAVIA CAROLLINE BREZINSKI

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Astyanax lacustris* (LÜTKEN,
1875) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DAS BACIAS DO
ALTO RIO URUGUAI, ALTO E BAIXO RIO PARANÁ E ALTO
RIO SÃO FRANCISCO**

Cascavel
2022

FLAVIA CAROLLINE BREZINSKI

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Astyanax lacustris* (LÜTKEN, 1875) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DAS BACIAS DO ALTO RIO URUGUAI, ALTO E BAIXO RIO PARANÁ E ALTO RIO SÃO FRANCISCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariane Gavazzoni

Cascavel
2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Brezinski, Flavia Caroline
Taxonomia integrativa de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)
(Characiformes, Characidae) das bacias do Alto rio Uruguai,
Alto e Baixo rio Paraná e Alto rio São Francisco / Flavia
Caroline Brezinski; orientador Vladimir Pavan Margarido;
coorientadora Mariane Gavazzoni. -- Cascavel, 2022.
37 p.

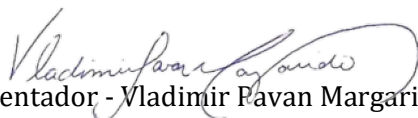
Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação
e Manejo de Recursos Naturais, 2022.

1. Citocromo B. 2. Citocromo Oxidase I. 3. Gray zone. 4.
Unidades taxonômicas operacionais. I. Margarido, Vladimir
Pavan, orient. II. Gavazzoni, Mariane, coorient. III. Título.

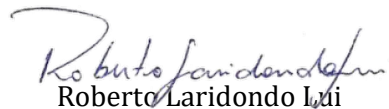
FLAVIA CAROLLINE BREZINSKI

**Taxonomia integrativa de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)
(Characiformes, Characidae) das bacias do Alto rio Uruguai, Alto e Baixo
rio Paraná e Alto rio São Francisco.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biodiversidade e valoração dos ambientes naturais, APROVADA pela seguinte banca examinadora:


Orientador - Vladimir Pavan Margarido

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Roberto Laridondo Lúzi

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Daniel Rodrigues Blanco

Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR - Campus de Santa Helena (UTFPR)

Defesa realizada em Cascavel, 29 de agosto de 2022.

Dedico este trabalho à
minha família, minha
maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e a Universidade Estadual de Maringá, que possibilitaram a realização das minhas atividades. Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, à coordenação e à secretária, por toda ajuda e atenção durante o mestrado. Aos professores, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por autorizar a captura dos peixes. À Unioeste, à UEM, ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), ao Parque Nacional do Iguaçu, Macuco Safari, a CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba) e ao Edson Vieira Sampaio pelo apoio logístico.

Aos órgãos de fomento Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e PTI (Parque Tecnológico Itaipu) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Vladimir Pavan Margarido pela orientação e pela oportunidade de trabalho ao longo destes anos. Obrigada pelo exemplo, por sua paciência e apoio, pelos ensinamentos, por exigir sempre o melhor, pelas coletas e por sua incansável determinação em melhorar a infraestrutura do laboratório para que este e tantos outros trabalhos pudessem ser realizados. Muito obrigada!

A Professora Mariane Gavazzoni pela orientação e pelo auxílio nas análises e redação da dissertação. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça, à Dra. Carla Simone Pavanelli e ao Dr. Carlos Alexandre de Miranda, pela identificação dos exemplares e pelas significativas contribuições ao longo deste trabalho.

À Dra. Carla Simone Pavanelli e ao Thiago Henrique Pedroso pelas análises morfométricas.

Aos que participaram das coletas, especialmente Vladimir Pavan Margarido, Roberto Laridondo Lui, Lucas Baumgartner, Leonardo Marcel Paiz, Orlando Moreira-Filho, Ezequiel Aguiar de Oliveira, Geraldo S. Zientarski, Adélio Ortiz e Fernandes J. Luzzi.

A todos os integrantes do laboratório, que de uma forma ou de outra contribuíram com a realização deste trabalho.

À minha família pela compreensão e apoio, por serem minha base, meu primeiro exemplo, e por contribuírem para eu chegar até aqui... amo vocês! Agradeço principalmente minha mãe Marlene por ser minha grande inspiração como mulher, como profissional e como pessoa, obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim, o seu amor e sua dedicação foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Ao meu pai Marcio por sempre me apoiar e incentivar com amor. Ao meu irmão Felipe por estar sempre ao meu lado, por todo apoio e compreensão. Obrigada pela paciência e por todo amor e carinho!

Aos meus amigos da Universidade, que estiveram desde o início da graduação ao meu lado, Jaqueline, Bruna, Ana e Willian, por me apoiarem nos melhores e piores momentos, por escutarem meus desbafos e me incentivarem a continuar, aos meus amigos da vida toda, Nathalie e Giovani, por sempre me apoiarem e aconselharem, vocês foram fundamentais nesta caminhada. Agradeço também as minhas amigas de trabalho Valquíria, Leticia, Priscila e Iveline por sempre acreditarem em mim. Cada um tem um lugar especial no meu coração, vocês todos foram essenciais nessa caminhada. Amo todos vocês.

Obrigada a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram com a minha formação e com a realização deste trabalho, aos antigos e novos amigos, e aos que estiveram e estarão ao meu lado sempre. Muito obrigada a todos!

Sumário

Artigo Taxonomia integrativa de <i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1875) (Characiformes, Characidae) das bacias do Alto rio Uruguai, Alto e Baixo rio Paraná e Alto rio São Francisco.....	1
Resumo	1
Abstract	1
Introdução	2
Materiais e metodos	5
Espécimes	5
Análises citogenéticas	5
Análises moleculares	6
Análises morfométricas	7
Resultados	9
Análise citogenética	9
Análise molecular	11
Análise morfométrica	14
Discussão	19
Agradecimentos	21
Referências	22

Lista de Figuras

Figura 1. Marcos anatômicos externos (letras) usados para delimitar a rede de treliças, e as medidas (números) entre eles. A-J: focinho – maxilar (FOMAX, 1); A-I: focinho – istmo (FOCIST, 2); C-G: dorsal – pélvica (DORPELV, 3); C-D: dorsal – adiposa (DORADI, 4); C-H: peitoral – dorsal (PECTDOR, 5); G-H: peitoral – pélvica (PECTPELV, 6); F-G: pélvica – anal (PELVANAL, 7); D-G: pélvica – adiposa (PELVADI, 8); A-B: focinho – supraoccipital (FOSO, 9); B-J: maxilar – supraoccipital (MAXSO, 10); B-I: istmo – supraoccipital (ISTSO, 11); B-C: supraoccipital – dorsal (SODORS, 12); B-H: peitoral – supraoccipital (PECTSO, 13); D-H: peitoral – adiposa (PECTADI, 14); E-G: pélvica – caudal (PELVCAU, 15); D-F: anal – adiposa (ANADI, 16); E-F: anal – caudal (ANCAUD, 17); E-D: adiposa – caudal (ADICAUD, 18); I-J: istmo – maxilar (ISTMAX, 19); H-I: istmo – peitoral (ISTPECTO, 20); C-I: istmo – dorsal (ISTDORS, 21)8

Figura 2. Cariótipos de *Asytanax lacustris* corados por Giemsa (esquerda) e C-bandado (direita). Em destaque o par de cromossomos portador das AgRONS (esquerda) e os pares de cromossomos portadores de 5S rDNA e 18S rDNA (direita).....10

Figura 3. Cladogramas de relacionamento realizados com sequências *COI* (esquerda) e *CytB* (direita) geradas pelas análises *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) e *Maximum Parsimony* (MP). Os valores de *bootstrap* são representados nas ramificações. *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como grupo externo13

Figura 4. Análise discriminante linear (LDA) realizada com as medidas de treliças obtidas das seis espécies analisadas. (preto) *Psalidodon fasciatus*; (vermelho) *Astyanax jacuhiensis*; (azul) *Astyanax abramis*; (laranja) *Astyanax lacustris*; (verde) *Astyanax altiparanae*; (amarelo) *Astyanax asuncionensis*.....14

Figura Suplementar. Resultado da delimitação das espécies utilizando o modelo ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) com o modelo de distância Kimura (K80).....30

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Espécies utilizadas no presente estudo para análises citogenética(*), molecular (***) e morfológica (***)6
- Tabela 2.** - Dados citogenéticos de *Astyanax lacustris* do presente estudo, das demais espécies sinonimizadas e *Astyanax abramis* (Gavazzoni *et al.*, 2018).....9
- Tabela 3.** Distância genética Kimura-2 parâmetros calculada para o gene *COI* entre as unidades taxonômicas de *Astyanax* (abaixo da diagonal, em preto), valores de desvio padrão (acima da diagonal, em azul) e estimativas de divergência evolutiva média sobre pares de sequências dentro de grupos (em negrito). *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como *outgroup*.....11
- Tabela 4.** Distância genética Kimura-2 parâmetros calculada para o gene *CytB* entre as unidades taxonômicas de *Astyanax* (abaixo da diagonal, em preto), valores de desvio padrão (acima da diagonal, em azul) e estimativas de divergência evolutiva média sobre pares de sequências dentro de grupos (em negrito). *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como *outgroup*.....12
- Tabela 5.** Valores correspondentes a cada medida em cada um dos cinco eixos da análise. Os valores destacados em negrito são os que mais contribuíram para a separação dos grupos no eixo 115

Taxonomia integrativa de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Characiformes, Characidae) das bacias do Alto rio Uruguai, Alto e Baixo rio Paraná e Alto rio São Francisco

RESUMO

Astyanax apresenta grande riqueza de espécies e ampla distribuição geográfica, englobando espécies muito semelhantes e com delimitações taxonômicas pouco detalhadas, que por vezes resulta em sinonímias. No presente trabalho buscou através da integração da análise citogenética básica e molecular, da análise de sequências de DNA mitocondrial e da análise morfométrica reconhecer o status taxonômico das OTUs “*A. altiparanae*”, “*A. asuncionensis*”, “*Astyanax jacuhiensis*” que foram anteriormente sinonimizadas com *A. lacustris*. As análises citogenética e morfométrica não corroboraram a sinonimização, e sugerem que, adicionalmente a *A. lacustris*, as OTUs *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* são espécies válidas. Adicionalmente, a análise de sequências do DNA mitocondrial foi diagnóstica de *A. lacustris* em relação as demais espécies. A análise de diferentes caracteres propostos pela taxonomia integrativa utilizada nos mesmos indivíduos pôde fornecer maior confiabilidade e minimizar a subestimação da biodiversidade.

Palavras chave: Citocromo B, Citocromo Oxidase I, *Gray zone*, Unidades taxonômicas operacionais.

ABSTRACT

Astyanax presents great species richness and wide geographic distribution, comprising very similar species and with low detailed taxonomic delimitations, which sometimes results in synonyms. In the present work, we aim through the integration of basic and molecular cytogenetic analysis, analysis of mitochondrial DNA sequences and morphometric analysis to recognize the taxonomic status of OTUs “*A. altiparanae*”, “*A. asuncionensis*”, “*Astyanax jacuhiensis*” that were previously synonymized with *A. lacustris*. Cytogenetic and morphometric analyzes did not corroborate the synonymization, and suggest that, in addition to *A. lacustris*, the OTUs *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* and *A. jacuhiensis* are valid species. Additionally, the analysis of mitochondrial DNA sequences was diagnostic of *A. lacustris* in relation to the other species. The analysis of different characters proposed by the integrative taxonomy used in the same individuals could provide greater reliability and minimize the underestimation of biodiversity.

Keywords: Cytochrome b, Cytochrome Oxidase I, *Gray zone*, Operational taxonomic units

INTRODUÇÃO

A região Neotropical compreende as regiões da América Central, América do Sul, incluindo parte do sul do México e da península baixa Califórnia e ilhas do Caribe, sendo a região que abriga a maior diversidade de espécies de peixes de água doce no mundo, com cerca de 5.160 espécies pertencentes a 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens (Nelson *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016). Essa riqueza de espécies pode ser explicada pela presença de um ecossistema diverso, pela história geológica e presença de diversos sistemas hidrográficos com características ambientais e ictiofaunísticas próprias (Barletta *et al.*, 2010). A ictiofauna brasileira de água doce compreende aproximadamente 3.500 espécies de peixes, sendo Characiformes o grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul (Rosa & Lima, 2008; Fricke *et al.*, 2022). Seus membros são amplamente distribuídos nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e La Plata (Mirande, 2010). Esse grupo ainda possui uma filogenia incerta, estando constantemente sujeitos a mudanças em sua classificação (Mirande, 2009).

Na região Neotropical, as espécies de *Astyanax* são especialmente abundante nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. Sua área de distribuição compreende grandes sistemas fluviais como como o Rio da Prata, São Francisco e Madalena, pequenas bacias, incluindo a maioria das bacias costeiras da América Central e do Sul e também as cabeceiras e afluentes dos sistemas Amazonas e Orinoco (Terán *et al.*, 2020).

De acordo com Eigenmann (1917, 1921), *Astyanax* é diagnosticada pela presença de duas séries de dentes na pré-maxila (a primeira série com uma variável número de dentes e a segunda série com geralmente cinco), coroas de pré-maxilares e mandibulares dentes geralmente sulcados e denticulados, maxila com 0-9 dentes, linha lateral completa, ausência de espinha pré-dorsal e uma nadadeira caudal nua. *Astyanax* foi primeiramente inserido em Tetragonopterinae, mas posteriormente foi agrupado em *incertae sedis* em Characidae (Lima *et al.*, 2003) e atualmente está incluso em Stethaprioninae (Mirande, 2018).

Segundo Terán *et al.* (2020), até recentemente, muitas espécies inclusas em *Astyanax* eram difíceis de distinguir de cada outras, e frequentemente identificadas apenas no nível genérico ou em complexos espécies, como o grupo *Astyanax bimaculatus*, *A. fasciatus* gr., *A. orthodus* gr., *A. paucidens* gr. ou *A. scabripinnis* gr. Devido a grande diversidade de espécies e dificuldades na sua identificação, muitos autores reconheciam

Astyanax como uma unidade não monofilética (Mirande, 2009, 2010, 2019; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Schmitter-Soto, 2016).

Terán *et al.* (2020) realizaram uma revisão em *Astyanax*, e neste trabalho ressuscitaram *Psalidodon*, além de proporem dois novos gêneros, *Andromakhe* e *Makunaima*. Ainda, as espécies de *Astyanax* foram arranjadas em 8 gêneros: *Astyanax* (99 espécies), *Andromakhe* (5 espécies), *Deuterodon* (10 espécies), *Eretmobrycon* (2 espécies), *Jubiapa* (15 espécies), *Makunaima* (3 espécies), *Psalidodon* (29 espécies) e *Tetragonopterus* (1 espécie). Desta forma, atualmente *Astyanax* pode ser diagnosticado dos demais Stethaprioninae pelas seguintes combinações de caracteres: poro laterossensorial anterior à fossa dilatadora orientada lateroventralmente, rinosfenóide (quando presente) sem uma expansão dorsal entre os nervos olfatórios, presença de um “círculo” no campo posterior das escamas, presença de um anterior ramo do túbulo para passagem de vasos sanguíneos em porção lamelar da maxila, nadadeira caudal nua e uma linha lateral completa.

Dentre os *Astyanax*, complexo *Astyanax bimaculatus* é composto por 19 espécies: *A. abramis*, *A. lacustris*, *A. altiparanae* (sinônimo de *A. lacustris*), *A. assunciones*, *A. jacuhiensis* (sinônimo de *A. lacustris*), *A. asuncionensis* (sinônimo de *A. lacustris*), *A. argyrimarginatus*, *A. clavitaeniatus*, *A. goyacensis*, *A. incaicus*, *A. maculisquamis*, *A. novae*, *A. rupununi*, *A. saltor*, *A. siapae*, *A. unitaeniatus*, *A. utiariti*, *A. validus*, *A. borealis* (incerto como *A. bimaculatus*), *A. paraguayensis* (sinônimo de *A. lacustris*), *A. orthodus* e *A. superbus* (Cunha, 2014; Lucena & Soares, 2016). Lucena & Soares (2016) sugeriram *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* como sinônimos juniores de *A. lacustris* (Lütken 1875), e considerado apenas *A. lacustris* como espécie válida. Apesar das conclusões, os autores recomendam pesquisas adicionais sobre os mecanismos que isolaram essas linhagens dentro do subgrupo. Gavazzoni *et al.* (2018), utilizando análises citogenéticas básicas e moleculares encontraram diferenças significativas que não justificavam a sinonimização proposta, e sugerem tratar de 4 espécies distintas.

A classificação dos seres vivos é chamada de taxonomia, teve origem na Grécia antiga, e a quase 250 anos Linnaeus iniciou a classificação binomial a qual é usada até hoje (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). A nomenclatura assegura nome único e distinto para cada táxon e promove estabilidade e universalidade dos nomes científicos e para tornar o processo de taxonomia mais rápido e aumentar a precisão, surge a abordagem da taxonomia integrativa, a qual é utilizada principalmente quando apenas a taxonomia tradicional não é suficiente para delimitar ou identificar uma espécie (Schlick-Steiner *et*

al., 2010). Os táxons propostos baseados em dados integrados são mais bem definidos e as hipóteses são mais bem sustentadas para o desenvolvimento de outros estudos, pois espécies mal definidas levam a respostas incorretas em qualquer área de estudo, e isto evidencia a importância dessa proposta (Pires & Marinoni, 2010). Além disso, o grau de confiança em espécies embasadas em diferentes tipos de dados é muito mais alto do que para espécies que tenham como base apenas um tipo de dado como é feita na taxonomia tradicional (Dayrat, 2005). Entretanto, a taxonomia integrativa não substitui a taxonomia tradicional, ela apenas a complementa, acelera o processo e melhora o rigor (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Nesta abordagem, diferentes métodos de identificação e delimitação de espécies são utilizados de forma simultânea e complementar, como por exemplo: filogeografia, morfologia, genética, ecologia, desenvolvimento, comportamento, entre outras (Dayrat, 2005).

Dentre os métodos de identificação utilizados na taxonomia integrativa, a citogenética possui um papel muito importante, oferecendo um grande potencial para compreensão da estrutura e composição do material genético de peixes, além de diversas outras contribuições para taxonomia e evolução (Bertollo *et al.*, 1986; Foresti, 2008;). A citogenética de peixes no Brasil iniciou na década de 70 (Bertollo *et al.*, 2017) e desde então muitos estudos citogenéticos vem sendo realizados nestes organismos, usando principalmente métodos tradicionais para descrever cariótipos (Yano *et al.*, 2017). Esta área de estudo é uma importante fonte de informações para as ciências e, além das metodologias convencionais como coloração de Giemsa e a técnica de bandamento cromossômico, nos últimos anos vem sendo utilizada também a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a pintura cromossômica total (WCP) e a hibridização genômica comparativa (CGH) (Cioffi *et al.*, 2018).

Tendo em vista a problemática taxonômica que envolve as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) “*Astyanax jacuhiensis*” (Bacia do rio Uruguai), “*A. asuncionensis*” (Bacia do Baixo rio Paraná), “*A. altiparanae*” (Bacia do Alto rio Paraná) e *A. lacustris* (Bacia do rio São Francisco), no presente trabalho pretende-se, através da utilização conjunta da citogenética, da análise de sequências do genoma mitocondrial e da análise morfométrica, verificar o *status* taxonômico das OTUs acima citadas. Adicionalmente, *A. abramis* (Jenyns, 1842) também tem seus dados (cromossômicos, sequências do genoma mitocondrial e morfometria) comparados uma vez que esta espécie ocorre em simpatria com “*A. asuncionensis*” e dados moleculares não a distingue das demais acima sinonimizadas (Rossini *et al.*, 2016).

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes. Dez espécimes de *Astyanax lacustris* (5 machos e 5 fêmeas) foram coletados no rio São Francisco, Três Marias, Minas Gerais (18°11'15"S; 45°15'12"O), e depositados na coleção de peixes do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil (NUP 22599). Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (número de licença: protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste). Todos os indivíduos foram anestesiados e mortos por overdose de óleo de cravo seguindo Griffiths (2000).

Análises citogenéticas. As preparações cromossômicas foram obtidas de células da porção anterior do rim seguindo Bertollo *et al.* (2015). As regiões organizadoras nucleolares (RONs) foram reveladas pela impregnação de prata de acordo com Howell & Black (1980) e o bandeamento C seguindo Sumner (1972), com modificações sugeridas por Lui *et al.* (2012). O mapeamento físico do 5S rDNA e 18S rDNA foi realizado por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de acordo com Pinkel *et al.* (1986) e modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho (2008), utilizando sondas de DNA obtidas de *Megaleporinus obtusidens* (citado como *Leporinus elongatus*, Martins & Galetti-Jr., 1999) e *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti-Jr., 2004), respectivamente. As sondas foram marcadas pelo método de *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (5S rDNA) e biotina-16-dUTP (18S rDNA) (Roche). A detecção dos sinais foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche) para a sonda do 5S rDNA, e amplificado isotiocianato de avidina-fluoresceína com anti-avidina biotilado (Sigma-Aldrich) para a sonda do 18S rDNA, com os cromossomos contracolorados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 50 µg/mL). As metáfases foram fotografadas usando um microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado a uma câmera digital Olympus DP 71 (Olympus America, Inc.) com o software Olympus DP Controller v.3.2.1.276. Os cromossomos foram classificados e organizados de acordo com Levan *et al.* (1964) como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a).

Análises moleculares. A extração do DNA total do tecido hepático preservado em etanol 100% foi realizada com o GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA genômico foi

quantificado em um nanoespectrofotômetro NanoK (Kasvi) e então diluído para uma concentração de 10 ng/ μ L. Para as análises moleculares foram utilizados 2 indivíduos de *A. abramis*, 2 indivíduos de “*A. asuncionensis*”, 2 indivíduos de “*A. altiparanae*”, 2 indivíduos de “*A. jacuhiensis*”, 3 indivíduos de *A. lacustris*, 1 indivíduo de *A. aff. bimaculatus*, e para *outgroup*, 1 indivíduo de *P. fasciatus* e 1 indivíduo de *P. eigenmanniorum* (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies utilizadas no presente estudo para análises citogenética(*), molecular (***) e morfológica (***).

Espécie	Localidade/Rio	Bacia Hidrográfica	Voucher
*, **, *** <i>A. lacustris</i>	Rio São Francisco	Alto rio São Francisco	NUP 22599
, * “ <i>A. altiparanae</i> ”	Rio Paraná	Alto rio Paraná	NUP 17156
, * “ <i>A. asuncionensis</i> ”	Rio Iguaçu*	Baixo rio Paraná	NUP 14584
, * “ <i>A. jacuhiensis</i> ”	Rio Ijuí	Alto rio Uruguai	NUP 14927
, * <i>A. abramis</i>	Rio Iguaçu*	Baixo rio Paraná	NUP 14581
** <i>A. aff. bimaculatus</i>	Rio do Peixe	Bacia do rio Amazonas	
, * <i>P. fasciatus</i>	Rio São Francisco	Alto rio São Francisco	NUP 22600
** <i>P. eigenmanniorum</i>	Rio Ijuí	Alto rio Uruguai	NUP 17785

Para amplificação de parte do gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial foram utilizados os *primers* FISHF1 (5’ TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3’) e FISHR1 (5’ TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3’) (Ward *et al.*, 2005), e a reação de PCR contendo 2,5 μ L de tampão de reação 10X, 0,65 μ L MgCl₂ (50mM), 4,0 μ L dNTP Mix (1,25 mM), 1,0 μ L de cada primer (10 μ m), 2 μ L DNA (50 ng/ μ L), 0,2 μ L Taq Polimerase (5 U/ μ L) e 13,65 μ L de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C (2 minutos), 36 ciclos de 94°C (30 segundos), 54°C (30 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (10 minutos).

Para amplificação de parte do gene Citocromo B do DNA mitocondrial foram utilizados os *primers* AnosCytBF (5’ AAYATCTCYGCATGATGAAA 3’) e AnosCytBR (5’ TCTTCGGATTACAAGACCG 3’) (Ramirez *et al.*, 2015), e a reação de PCR contendo 5,0 μ L de tampão de reação 10X, 1,5 μ L MgCl₂ (50mM), 8,0 μ L dNTP Mix (1,25 mM), 2,0 μ L de cada primer, 2 μ L DNA (50 ng/ μ L), 0,4 μ L Taq Polimerase e 27,1 μ L de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (4 minutos), 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53°C (90 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (5 minutos).

Os produtos finais de PCR foram purificados com o *Wizard Kit SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram sequenciadas no Centro de Pesquisa do Genoma Humano, Universidade de São

Paulo, Brasil. As sequências foram então editadas com BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no Mega X (Kumar *et al.*, 2018). O sinal de saturação foi verificado pelo DAMBE v7.0.28 (Xia, 2018), e o modelo 3 de melhor ajuste foi escolhido usando o Akaike Information Criterion usando jModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012). A história evolutiva foi inferida usando o Neighbor-Joining (NJ) baseado no método de 2 parâmetros de Kimura; o método da Máxima Verossimilhança (ML) baseado no modelo Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição Gamma (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2988)); e o método de Máxima Parcimônia (MP), com 1.000 repetições bootstrap, foram conduzidos no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). A delimitação das espécies foi realizada utilizando o modelo ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) (Puillandre *et al.*, 2012) em <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>, utilizando como entrada um arquivo *fasta*; o modelo de distância Kimura (K80) e a distância simples foram analisados no resultado final.

Análises morfométricas. Foram analisados 50 indivíduos pertencentes a seis espécies, que foram previamente identificadas como *Psalidodon fasciatus* (NUP 22600), “*Astyanax jacuhiensis*” (NUP 14927), *Astyanax abramis* (NUP 14581), *Astyanax lacustris* (NUP 022599), “*Astyanax altiparanae*” (NUP 17156) e “*Astyanax asuncionensis*” (NUP 14584). Para a análise morfológica foram realizadas medidas e contagens comuns à taxonomia de caracídeos, usando como base a metodologia proposta por Fink & Weitzman (1974). As medidas foram feitas com auxílio de um paquímetro digital e um estereomicroscópio, realizadas do lado esquerdo do peixe, sempre que possível. Além das medidas tradicionais, foram tomadas medidas de treliças segundo metodologia apresentada por Strauss & Bookstein (1982), com a determinação de 10 marcos anatômicos externos, representando a forma do peixe, formando assim a rede de treliças com 21 medidas tomadas entre os pontos (Fig. 1).

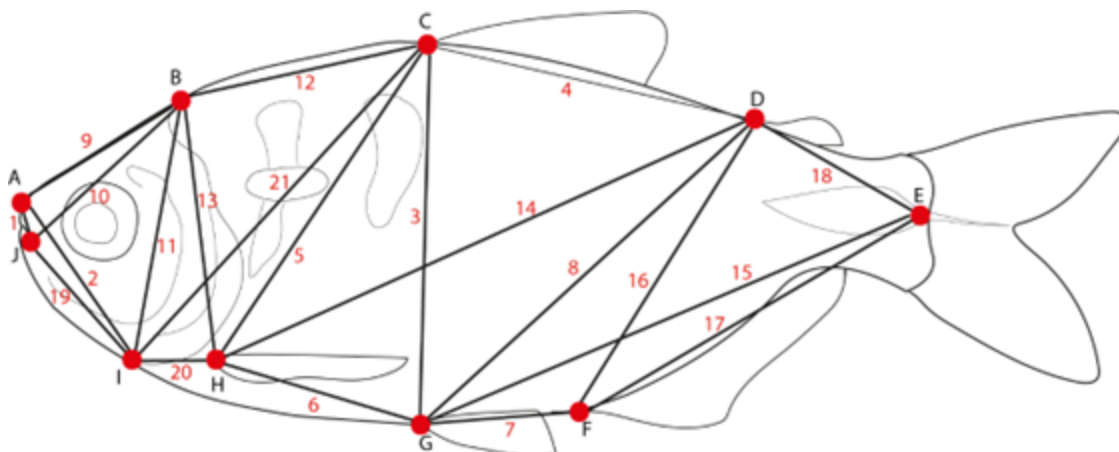


Figura 1. Marcos anatômicos externos (letras) usados para delimitar a rede de treliças, e as medidas (números) entre eles. A-J: focinho – maxilar (FOMAX, 1); A-I: focinho – istmo (FOCIST, 2); C-G: dorsal – pélvica (DORPELV, 3); C-D: dorsal – adiposa (DORADI, 4); C-H: peitoral – dorsal (PECTDOR, 5); G-H: peitoral – pélvica (PECTPELV, 6); F-G: pélvica – anal (PELVANAL, 7); D-G: pélvica – adiposa (PELVADI, 8); A-B: focinho – supraoccipital (FOSO, 9); B-J: maxilar – supraoccipital (MAXSO, 10); B-I: istmo – supraoccipital (ISTSO, 11); B-C: supraoccipital – dorsal (SODORS, 12); B-H: peitoral – supraoccipital (PECTSO, 13); D-H: peitoral – adiposa (PECTADI, 14); E-G: pélvica – caudal (PELVCAU, 15); D-F: anal – adiposa (ANADI, 16); E-F: anal – caudal (ANCAUD, 17); E-D: adiposa – caudal (ADICAUD, 18); I-J: istmo – maxilar (ISTMAX, 19); H-I: istmo – peitoral (ISTPECTO, 20); C-I: istmo – dorsal (ISTDORS, 21).

Os dados foram sujeitos a uma análise discriminante linear (LDA), com o uso do *Software* PAST 4.03, que tem como objetivo determinar quais variáveis apresentam maior peso para separação dessas espécies. A transformação dos dados foi feita com auxílio do *Software* Microsoft Excel (2019), onde as medidas de treliças seleccionadas pela análise foram transformadas em percentuais em relação a cada uma das medidas contidas na tabela, afim de se detectar uma combinação de variáveis diagnósticas, e são apresentadas no texto somente quando não apresentam valores sobrepostos.

RESULTADOS

Análise citogenética. O número diplóide encontrado foi de 50 cromossomos ($10m + 26sm + 8st + 6a$, $FN = 94$) para machos e fêmeas (Fig. 2). Um único par de RONS foi localizado em posição terminal no braço curto do par cromossômico 23 (Fig. 2). O bandamento C mostrou blocos de heterocromatina centromérica nos pares 2, 3 e 4, heterocromatina intersticial-proximal no braço longo dos pares 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 22 e 23, e coincidente com as RONS (Fig. 2). A FISH revelou um único sítio de rDNA 5S em posição centromérica no par m 4 e um único sítio de rDNA 18S em posição terminal no braço curto do par a 23 (Fig. 2). Os dados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados citogenéticos de *Astyanax lacustris* do presente estudo, das demais espécies sinonimizadas e *Astyanax abramis* (Gavazzoni *et al.*, 2018).

Espécie	Cariótipo	Heterocromatina	AgRONS 18S rDNA	5S rDNA
<i>A. lacustris</i>	$10m+26sm+8st+6a$	Pálida-Centromérica / pericentromérica	term p a 19	cent m 4
" <i>A. altiparanae</i> "	$6m+28sm+4st+12a$	Pálida-Centromérica / pericentromérica	term p a 20	cent m 2
" <i>A. asuncionensis</i> "	$8m+24sm+6st+12a$	Pálida-Centromérica / pericentromérica	term p a 20	cent sm 9
" <i>A. jacuhiensis</i> "	$8m+28sm+6st+8a$	Pálida-Centromérica / pericentromérica	term p a 22	cent m 2 e st 20
<i>A. abramis</i>	$4m+30sm+8st+8a$	Pálida- Centromérica / pericentromérica	term p a 22	cent sm 7 e st 20

p: braço curto, m: metacêntrico, sm: submetacêntrico, st: subteloicêntrico, a: acrocêntrico, term: terminal, cent: centromérico.

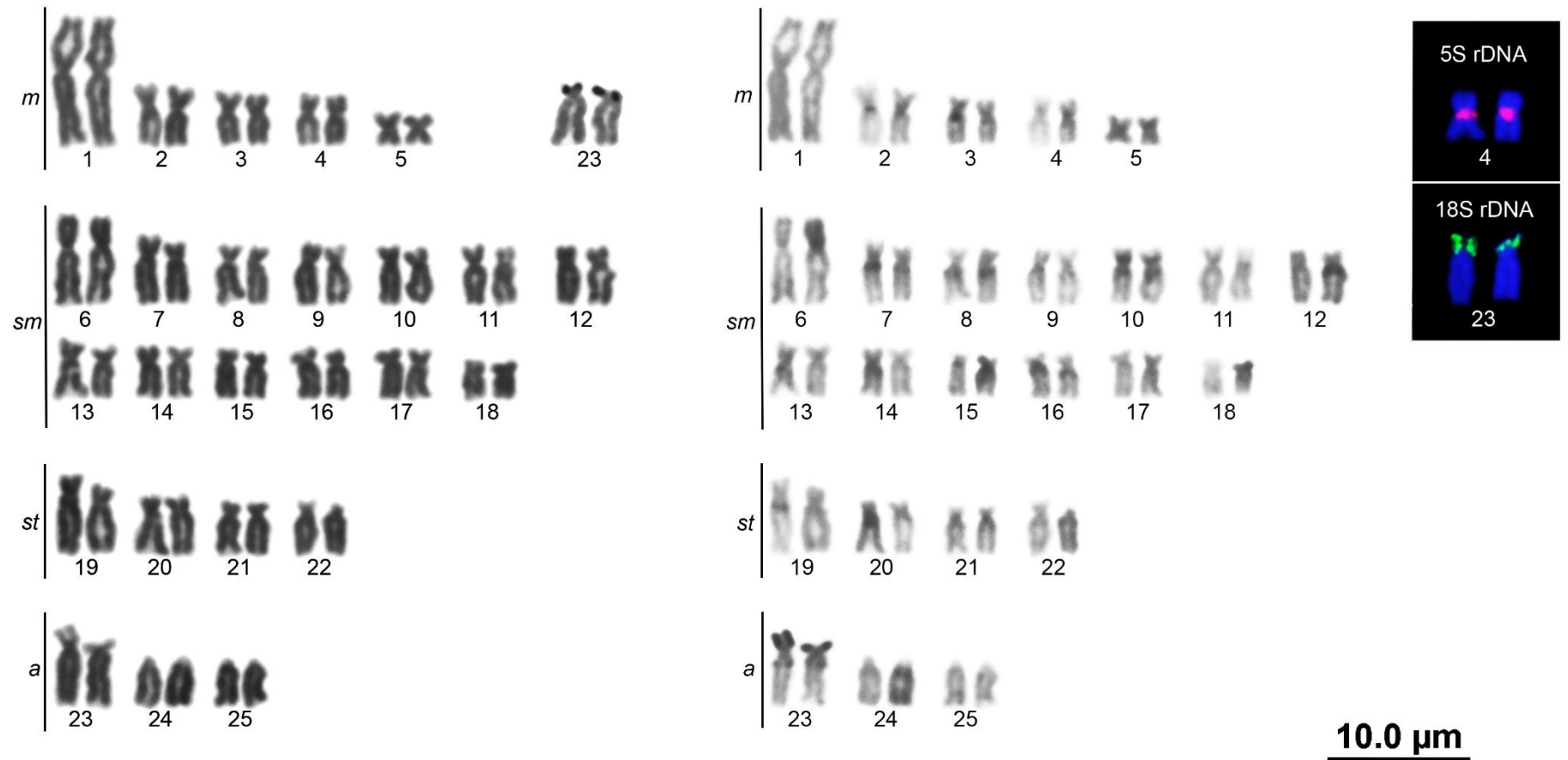


Figura 2 – Cariótipos de *Asytanax lacustris* corados por Giemsa (esquerda) e C-bandado (direita). Em destaque o par de cromossomos portador das AgRONS (esquerda) e os pares de cromossomos portadores de 5S rDNA e 18S rDNA (direita).

Análise molecular

Citocromo Oxidase I

A matriz *COI* contém 12 terminais e 625 bp com 60 sites variáveis (9,6%) mais dois terminais como grupo externo. A distância média geral é $0,033 \pm 0,005$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Distância genética Kimura-2 parâmetros calculada para o gene *COI* entre as unidades taxonômicas de *Astyanax* (abaixo da diagonal, em preto), valores de desvio padrão (acima da diagonal, em azul) e estimativas de divergência evolutiva média sobre pares de sequências dentro de grupos (em negrito). *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como *outgroup*.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7
1. " <i>A. altiparanae</i> "	0,025	0,003	0,003	0,004	0,015	0,008	0,024
2. " <i>A. asuncionensis</i> "	0,013	0,000	0,001	0,007	0,016	0,008	0,024
3. <i>A. abramis</i>	0,013	0,001	0,002	0,007	0,016	0,008	0,024
4. " <i>A. jacuhiensis</i> "	0,014	0,027	0,028	0,000	0,015	0,009	0,024
5. <i>A. aff. bimaculatus</i>	0,088	0,091	0,092	0,084	---	0,014	0,021
6. <i>A. lacustris</i>	0,034	0,029	0,030	0,040	0,079	0,001	0,023
7. Outgroup	0,185	0,181	0,181	0,188	0,154	0,171	0,105

Todas as árvores, resultantes da análise filogenética (NJ, ML e MP) do gene *COI*, evidenciaram que os espécimes aqui analisados formaram um grupo monofilético com altos valores de *bootstrap*. Quatro clados foram formados: 1 – *A. abramis*, “*A. asuncionensis*” e “*A. altiparanae*”, 2 – “*A. jacuhiensis*” e “*A. altiparanae*”, 3 – *A. lacustris* e 4- *A. aff. bimaculatus* (Fig. 3). A árvore derivada do modelo ABGD para delimitação de espécies apresentou a mesma disposição de NJ, ML e MP entre os grupos (Fig. Suplementar).

Citocromo B

A matriz COI contém 12 terminais e 845 bp com 108 sites variáveis (12,8%) mais dois terminais como grupo externo. A distância média geral é $0,082 \pm 0,007$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Distância genética Kimura-2 parâmetros calculada para o gene *CytB* entre as unidades taxonômicas de *Astyanax* (abaixo da diagonal, em preto), valores de desvio padrão (acima da diagonal, em azul) e estimativas de divergência evolutiva média sobre pares de sequências dentro de grupos (em negrito). *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como *outgroup*.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>A. bimaculatus</i>	---	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016	0,018
2. <i>A. lacustris</i>	0,118	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007	0,021
3. <i>A. abramis</i>	0,116	0,037	0,002	0,001	0,003	0,004	0,021
4. " <i>A. asuncionensis</i> "	0,118	0,038	0,002	0,002	0,003	0,004	0,021
5. " <i>A. altiparanae</i> "	0,121	0,039	0,010	0,010	0,016	0,003	0,021
6. " <i>A. jacuhiensis</i> "	0,120	0,037	0,015	0,016	0,010	0,000	0,021
7. Outgroup	0,172	0,208	0,203	0,203	0,203	0,201	0,119

Todas as árvores, resultantes da análise filogenética (NJ, ML e MP) do gene *CytB*, evidenciaram que os espécimes aqui analisados formaram um grupo monofilético com altos valores de *bootstrap*. Quatro clados foram formados: 1 – *A. abramis*, "*A. asuncionensis*" e "*A. altiparanae*", 2 – "*A. jacuhiensis*" e "*A. altiparanae*", 3 – *A. lacustris* e 4- *A. aff. bimaculatus* (Fig. 3).

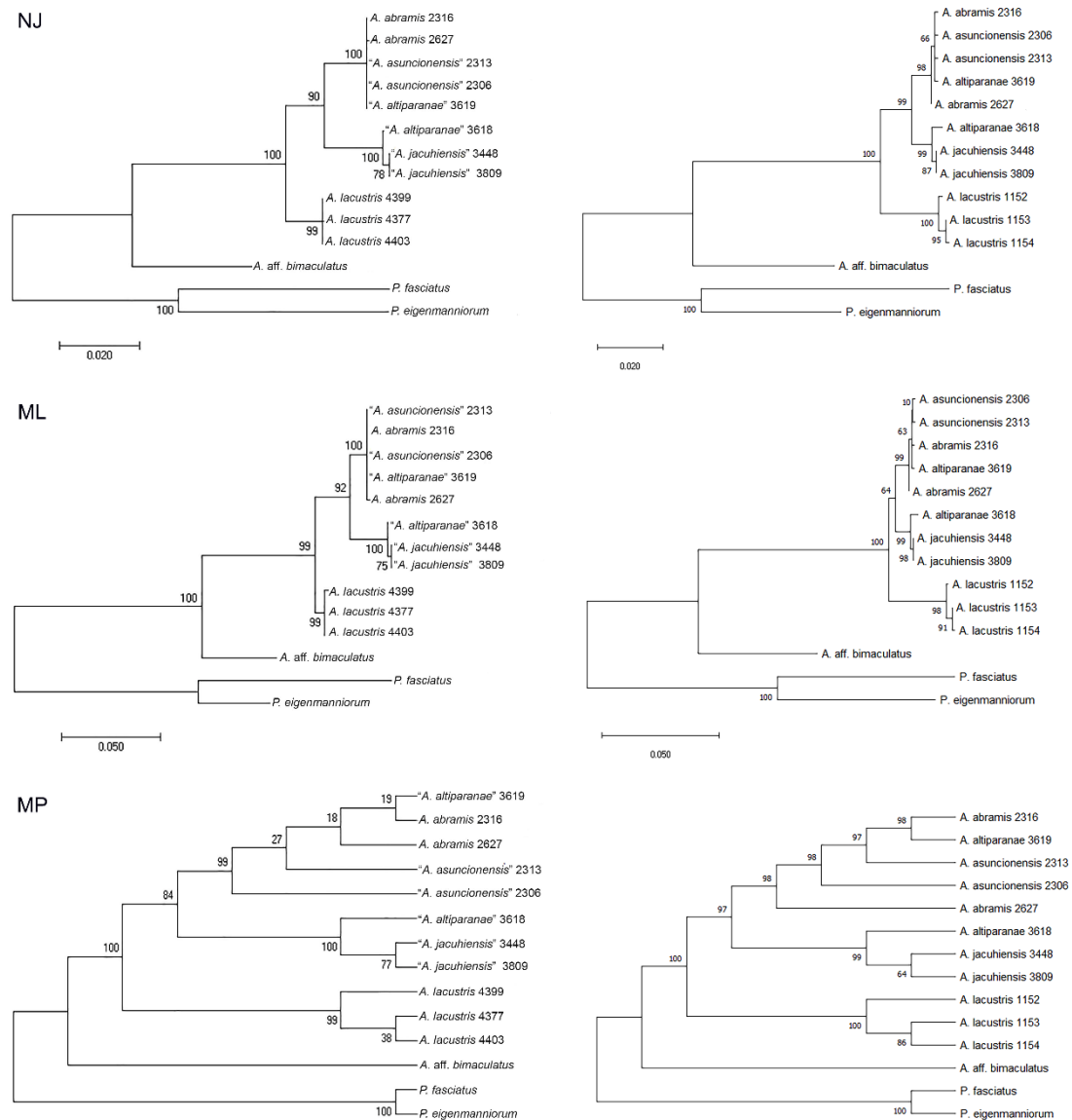


Figura 3 - Cladogramas de relacionamento realizados com seqüências *COI* (esquerda) e *CytB* (direita) geradas pelas análises *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) e *Maximum Parsimony* (MP). Os valores de *bootstrap* são representados nas ramificações. *Psalidodon fasciatus* e *P. eigenmanniorum* foram utilizadas como grupo externo.

Análise morfométrica

As análises realizadas através da comparação entre os dados morfométricos obtidos confirmaram a identidade das seis espécies previamente reconhecidas (Fig. 4), como *Astyanax abramis* (Jenyns, 1842), *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000, *Astyanax asuncionensis* Gery 1972, *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819). Os escores das variáveis que mais contribuíram para a separação das espécies estão apresentados na Tabela 5.

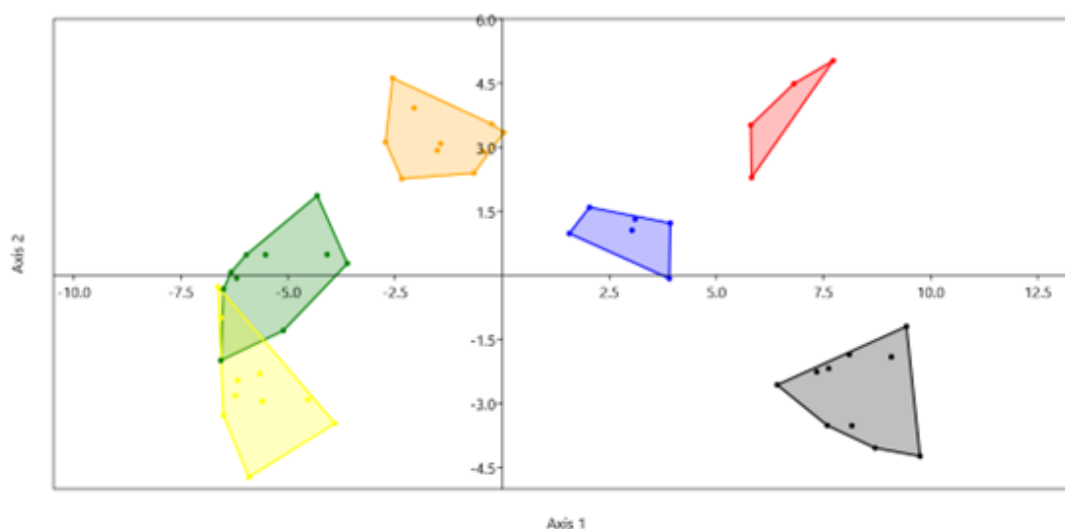


Figura 4. Análise discriminante linear (LDA) realizada com as medidas de treliças obtidas das seis espécies analisadas. (preto) *Psalidodon fasciatus*; (vermelho) *Astyanax jacuhiensis*; (azul) *Astyanax abramis*; (laranja) *Astyanax lacustris*; (verde) *Astyanax altiparanae*; (amarelo) *Astyanax asuncionensis*.

A análise discriminante linear indicou a presença de seis grupos distintos (Fig. 4), sendo que os três primeiros eixos explicaram 94,0% da variação dos dados. O primeiro eixo representa 69,3% da variação, e as variáveis que mais contribuíram para a separação foram a distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (PECTPELV), distância entre o focinho e o supraoccipital (FOSO), distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital (MAXSO), distância entre o istmo e o supraoccipital (ISTSO), distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal (SODORS) e distância entre as nadadeiras peitoral e adiposa (PECTADI).

Tabela 5. Valores correspondentes a cada medida em cada um dos cinco eixos da análise. Os valores destacados em negrito são os que mais contribuíram para a separação dos grupos no eixo 1.

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5
FOCMAX	-0,04998	-0,04178	0,056319	0,10625	0,04599
FOCIST	-0,04121	-0,03713	0,29222	0,19791	-0,01025
DORPELV	-0,03021	-0,45052	1,2978	0,41396	-0,75663
DORADI	0,057621	-0,88746	1,3002	0,27084	-0,34192
PECTDOR	0,06214	-0,39338	1,1589	0,10771	-0,5218
PECTPELV	0,20807	-0,58012	0,48948	0,15717	-0,02876
PELVANAL	0,052203	-0,20855	0,56048	0,18889	-0,22903
PELVADI	-0,04012	-0,81084	1,5004	-0,08483	-0,51547
FOSO	-0,26084	-0,61274	0,44715	-0,05741	0,19491
MAXSO	-0,29742	-0,505	0,55654	-0,12041	0,26145
ISTSO	-0,25264	-0,57282	0,62598	-0,05164	0,11016
SODORS	0,3717	0,10228	0,70464	0,11511	-0,32245
PECTSO	-0,16634	-0,24606	0,94082	0,20055	0,052057
PECTADI	0,19287	-1,1626	1,8048	0,026864	-0,26414
PELVCAU	0,001663	-0,94273	1,685	0,5144	-0,63009
ANADI	-0,01551	-0,66011	1,1563	-0,02354	-0,41351
ANCAUD	-0,01763	-0,93622	1,2938	-0,06003	-1,2993
ADICAUD	-0,01702	-0,1897	0,35223	0,25025	-0,14107
ISTMAX	-0,02275	-0,01007	0,26719	0,14487	-0,13633
ISTPECTO	-0,03422	-0,12705	0,51794	0,081619	0,009102
ISTDORS	0,11773	-0,42583	1,2909	0,23285	-0,3056

Astyanax lacustris difere de *A. jacuhiensis* pela maior distância entre o focinho e o supraoccipital (21,1-24,9% CP vs. 18,8-19,7), maior distância entre o focinho e o supraoccipital em relação ao comprimento pré-dorsal (40,5-47,6% FOANAL vs. 35,3-39,7), maior distância entre o focinho e o supraoccipital em relação ao comprimento pré-anal (30,6-37,1% FOANAL vs. 27,2-29,5), maior distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o focinho e a comissura maxilar (93,7-110,2%

FOMAX vs. 69,7-82,7); difere de *A. abramis* pela maior distância entre a órbita e a dorsal (40,9-43,6% CP vs. 35,9-39,8), maior distância pré-dorsal (51,4-54,7% CP vs. 47,7-51,0), maior distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à distância entre a nadadeira dorsal e a caudal (39,1-47,3% DORSCAU vs. 32,8-37,6), maior distância entre o focinho e o supraoccipital em relação à distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (55,6-67,0% DORADI vs. 46,3-52,0), menor comprimento entre as nadadeiras dorsal e adiposa em relação à distância entre o focinho e a nadadeira adiposa (43,0-45,5% FOCADI vs. 47,0-49,2); difere de *A. altiparanae* pela menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação à distância interorbital (52,4-62,0% INTEROR vs. 63,8-77,7), maior distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação à distância entre a nadadeira dorsal e a caudal (52,7-62,5% DORSCAU vs. 38,4-51,6), maior distância entre a nadadeira dorsal e caudal em relação ao comprimento pré-dorsal (95,1-100,8% FODORS vs. 78,8-94,0); difere de *A. asuncionensis* pela maior distância entre a órbita e a dorsal (40,9-43,6% CP vs. 36,7-39,1), maior distância pré-dorsal (51,4-54,7% CP vs. 47,7-50,3), menor distância entre a dorsal e a adiposa (37,0-40,1% CP vs. 41,0-43,7), maior distância entre o supraoccipital e a dorsal (28,4-32,0% CP vs. 22,4-26,1), menor distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação ao comprimento da cabeça (78,3-92,7% CC vs. 95,6-110,0), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à distância entre a órbita e a nadadeira dorsal (50,0-61,3% OLDORS vs. 64,7-69,1), menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação ao comprimento pré-dorsal (40,5-47,6% FODORS vs. 50,6-53,3), menor distância entre as nadadeiras peitoral e dorsal em relação à distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (83,5-93,2% DORADI vs. 98,4-105,9), menor distância entre as nadadeiras dorsal e pélvica em relação à distância entre a órbita e a nadadeira dorsal (89,7-101,% OLDORS vs. 103,2-112,5), maior distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa em relação ao comprimento da nadadeira dorsal (69,9-78,5% CDORS vs. 61,0-66,9); difere de *P. fasciatus* pelo maior comprimento da nadadeira pélvica (17,3-20,2% CP vs. 13,1-16,1), menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (18,2-22,1% CP vs. 23,0-25,2) e maior distância entre o istmo e a dorsal (51,9-53,5% CP vs. 49,1-51,3).

Astyanax jacuhiensis difere de *A. abramis* pela maior distância interorbital (38,4-41,5% CP vs. 34,8-37,9), menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação à distância interorbital (45,4-51,1% INTEROR vs. 52,7-59,4), maior distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação à distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (74,0-88,2% DORADI vs. 67,4-72,4), menor distância entre as nadadeiras

peitoral e dorsal em relação à distância entre o focinho e a comissura maxilar (8,3-9,5% FOMAX vs. 10,1-12,3), maior distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa em relação à altura do pedúnculo caudal (29,9-30,9% APEDUN vs. 27,7-28,3); difere de *A. altiparanae* pelo menor comprimento da cabeça (23,5-24,7% CP vs. 24,9-26,9), maior distância interorbital (38,4-41,5% CP vs. 33,7-38,4), menor distância entre focinho e supraoccipital (18,8-19,7% CP vs. 23,2-27,3), menor distância entre istmo e o supraoccipital (21,8-24,3% CP vs. 25,6-29,3), maior distância entre supraoccipital e a nadadeira dorsal (29,1-34,3% CP vs. 22,4-28,5), maior distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação à altura do corpo (71,7-82,7% AC vs. 55,8-70,2), menor distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação ao comprimento da cabeça (68,5-84,1% CC vs. 88,0-117,2), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à distância entre a nadadeira peitoral e o supraoccipital (69,7-75,0% PECTSO vs. 79,7-94,1), menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação à distância entre as nadadeiras peitoral e adiposa (27,1-29,7% PECTADI vs. 34,4-40,5), maior distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o istmo e o supraoccipital (86,1-98,9% ISTSO vs. 65,8-80,6), menor distância entre as nadadeiras peitoral e dorsal em relação à distância entre o focinho e a comissura maxilar (8,3-9,5% FOMAX vs. 11,1-16,4), menor distância entre as nadadeiras dorsal e pélvica em relação ao comprimento do focinho (12,9-15,7% CF vs. 16,2-18,9); difere de *A. asuncionensis* pela maior distância interorbital (38,4-41,5% CP vs. 34,7-37,4), maior distância entre a órbita e a dorsal (39,6-43,2% CP vs. 36,7-39,1), menor distância entre focinho e supraoccipital, (18,8-19,7% CP vs. 24,4-25,9), menor distância entre o istmo e o supraoccipital (21,8-24,3% CP vs. 26,8-28,8), maior distância entre o supraoccipital e a dorsal (29,1-34,3% CP vs. 22,4-26,1), maior distância entre as nadadeiras peitoral e dorsal em relação à distância entre as nadadeiras pélvica e adiposa (77,7-83,5% PELVADI vs. 74,3-77,1), maior distância entre as nadadeiras pélvica e adiposa em relação à distância entre a órbita e a nadadeira dorsal (75,1-81,0% OLDORS vs. 67,4-70,6), menor distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa em relação ao comprimento pré-dorsal (72,7-82,0% FODORS vs. 82,9-89,6), menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação à altura do corpo (43,4-50,6% AC vs. 57,1-63,1), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à altura do corpo (47,0-52,4% AC vs. 57,4-64,4), menor distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação ao comprimento da cabeça (68,5-84,1% CC vs. 95,6-110,0), menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o focinho e o supraoccipital

(86,6-103,1% FOSO vs. 114,4-132,2) e maior distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o istmo e o supraoccipital (86,1-98,9% ISTSO vs. 69,6-78,7); difere de *P. fasciatus* pela maior comprimento da nadadeira pélvica (17,6-18,6% CP vs. 13,1-16,1), menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (19,1-21,8% CP vs. 23,0-25,2) e maior distância entre a nadadeira peitoral e o supraoccipital (27,1-29,3% CP vs. 23,5-26,7).

Astyanax abramis difere das cinco espécies analisadas por apresentar um maior número de escamas na linha lateral (42 ou mais vs. 40 ou menos), maior número de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral (9 vs. 8 ou menos), difere de *A. altiparanae* pela menor distância entre o focinho e o supraoccipital (19,3-21,5% CP vs. 23,2-27,3), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital (19,0-21,6% CP vs. 24,0-27,3) e pela menor distância entre o istmo e o supraoccipital (21,3-24,4% CP vs. 25,6-29,3) maior distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação ao comprimento pré-dorsal (57,5-62,3% FODORS vs. 45,9-56,7), menor distância entre o focinho e o supraoccipital em relação ao comprimento pré-pélvica (38,8-45,2% FOPELVIC vs. 48,7-57,9), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à distância entre a nadadeira dorsal e caudal (32,8-37,6% DORSCAU vs. 40,6-48,0), maior distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o istmo e o supraoccipital (83,2-100,9% ISTSO vs. 65,8-80,6); difere de *A. asuncionensis* pela menor distância entre o focinho e o supraoccipital (19,3-21,5% CP vs. 24,4-25,9), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital 19,0-21,6% CP vs. 24,5-26,4), menor distância entre o istmo e supraoccipital (21,3-24,4% CP vs. 26,8-28,8) e maior distância entre o supraoccipital e nadadeira dorsal (27,6-31,8% CP vs. 22,4-26,1), maior distância entre o focinho e o supraoccipital em relação ao comprimento pré-anal (91,3-117,5% FOANAL vs. 73,9-84,0), menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica em relação à distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal (64,1-76,2% SODORS vs. 79,5-90,9), maior distância entre o supraoccipital e a nadadeira dorsal em relação à distância entre a nadadeira peitoral e o supraoccipital (101,1-114,0% PECTSO vs. 79,5-93,1), menor distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital em relação à distância entre a nadadeira pélvica e a caudal (32,6-37,4% PELVCAU vs. 40,3-49,6); difere de *P. fasciatus* pelo maior comprimento da nadadeira pélvica (16,1-18,5% CP vs. 13,1-16,1), maior comprimento da cabeça (23,6-26,2% CP vs. 21,4-23,6) e pela menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (18,2-22,8% CP vs. 23,0-25,2).

Astyanax altiparanae difere de *P. fasciatus* pelo maior comprimento da cabeça (24,9-26,9% CP vs. 21,4-23,6), menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (17,7-22,6% CP vs. 23,0-25,2), maior distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital (24,0-27,3% CP vs. 15,7-23,3) e maior distância entre a nadadeira peitoral e o supraoccipital (27,7-30,5% CP vs. 23,5-26,7).

Astyanax asuncionensis difere de *P. fasciatus* pela menor distância entre as nadadeiras peitoral e pélvica (19,2-22,4% CP vs. 23,0-25,2), maior distância entre o focinho e o supraoccipital (24,4-25,9% CP vs. 16,4-23,8) e maior distância entre a comissura maxilar e o supraoccipital (24,5-26,4% CP vs. 15,7-23,3).

DISCUSSÃO

As análises citogenética e morfométrica não corroboraram a sinonimização proposta por Lucena & Soares (2016), e sugerem que, adicionalmente a *Astyanax lacustris*, as OTUs *Astyanax altiparanae*, *Astyanax asuncionensis* e *Astyanax jacuhiensis* são espécies válidas. Adicionalmente, a análise de sequências do DNA mitocondrial foi diagnose de *A. lacustris* em relação as demais espécies. Poucos estudos de taxonomia integrativa utilizando os mesmo indivíduos com essas abordagens em conjunto (citogenética, sequências do DNA e morfologia/morfometria) visando a validação de espécies têm sido realizados na icitofauna Neotropical (Gavazzoni *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2022).

Apesar dos marcadores (1) número e distribuição das regiões organizadoras de nucléolos (Ag- e 18S rDNA) e (2) padrão de distribuição de heterocromatina serem conservados, a fórmula cariotípica foi eficiente na diferenciação das quatro OTUs: *A. altiparanae*, $6m+28sm+4st+12a$; *A. asuncionensis*, $8m+24sm+6st+12a$; *A. jacuhiensis*, $8m+28sm+6st+8a$; *A. lacustris*, $10m+26sm+8st+6a$. Com relação a número e localização dos cistrons de 5S rDNA, *A. lacustris* apresentou um único par portador (par 4, *m*), semelhante ao encontrado para *A. altiparanae* (par 2, *m*) e *A. asuncionensis* (par 9, *sm*), enquanto *A. jacuhiensis* apresenta sítios múltiplos (par 2, *m*; par 20, *st*) (Gavazzoni *et al.*, 2018). Em todos os casos, esses sítios são localizados em uma posição centromérica, mas em diferentes pares de cromossomos, embora possam ser considerados pares correspondentes aos pares *m* portadores em *A. lacustris*, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis*.

As análises realizadas através da comparação entre os dados morfométricos obtidos confirmaram a identidade das 4 espécies previamente reconhecidas. Apesar da

proposta de sinonimização, Lucena & Soares (2016) recomendam mais pesquisas sobre os mecanismos que isolaram essas linhagens dentro do subgrupo, em particular para determinar se o processo de especiação ocorreu sem diferenciação morfológica ou se as semelhanças morfológicas surgiram após a diferenciação genética devido à adoção de adaptações das espécies a semelhantes habitats. Resultados semelhantes foram observados em estudos de Gavazzoni *et al.* (2020) para duas espécies de *Psalidodon*, e de Rocha *et al.* (2022) para duas espécies de *Corydoras*; em ambos, a análise de caracteres morfológicos não eram suficientes para a diagnose das espécies.

As análises filogenéticas dos genes mitocôndrias *COI* e *CytB* (*Neighbor-Joining*, *Maximum Likelihood* e *Maximum Parsimony*) e de delimitação de espécies utilizando o modelo *Automatic Barcode Gap Discovery* obtiveram os mesmos resultados, nas quais *A. lacustris* pode ser diagnosticada das demais espécies sinonimizadas *Astyanax altiparanae*, *Astyanax asuncionensis* e *Astyanax jacuhiensis*, e também de *A. abramis* (espécie válida). Carvalho *et al.* (2011) e Rossini *et al.* (2016) analisaram as sequências de *COI* de espécies nominais pertencentes até então a *Astyanax* e constataram que, em alguns grupos (incluindo o grupo *A. lacustris*), as espécies estão agrupadas, dificultando sua delimitação confiável que, em muitos casos, se mostrou impossível, atribuindo a uma combinação de especiação rápida, espécies com ampla distribuição geográfica e a falta de descrições de morfotipos locais, bem como análises filogenéticas inadequadas. O mesmo também pode ser observado no complexo de espécies *Psalidodon fasciatus* (citados como *Astyanax fasciatus*) nos trabalhos de Rossini *et al.* (2016) e Pazza *et al.* (2017).

Ornelas-García *et al.* (2008), e Pereira *et al.* (2011) sugerem que a baixa diversidade genética usando DNA *barcoding* (sequências *COI*) em *Astyanax* e *Psalidodon* (anteriormente citado como *Astyanax*) pode ser o resultado do recente processo evolutivo de radiação. Pazza *et al.* (2017) sugerem que a taxa de divergência entre as populações de São Francisco e Paraná é consistente para diferentes espécies, separadas após o evento vicariante do soerguimento do Alto Paranaíba, e que politomia observada nos dados dos autores, representadas nas populações originárias das bacias dos rios São Francisco e Paraná, pode ser explicada pela rápida dispersão e diversificação acompanhando o processo de separação das população. O mesmo pode ser observado no presente estudo, onde *Astyanax altiparanae* (Alto rio Paraná) *Astyanax asuncionensis* (Baixo rio Paraná), *Astyanax jacuhiensis* (Alto rio Uruguai) e *Astyanax abramis* (Baixo rio Paraná) pertencem a bacia do Prata.

Embora o gene *COI* seja considerado eficiente para a identificação de espécies de peixes, com resultados efetivos em diversos estudos (Oliveira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013), essa ferramenta pode ser menos conclusiva em alguns casos quando comparada aos dados cromossômicos em grupos complexos, como *Rineloricaria* (Costa-Silva *et al.*, 2015) e *Prochilodus* (Melo *et al.*, 2018), indicando que este gene pode ser menos eficiente para clados taxonomicamente complexos com especiação recente.

O processo de especiação não é uniforme, não leva a alterações em todos os aspectos do organismo (morfológicos, ecológicos, genéticos, entre outros) ao mesmo tempo, gerando a *gray zone* (De Queiroz, 2007). Segundo De Queiroz (2007), a *gray zone* é o momento do processo de especiação que, dependendo dos caracteres utilizados e avaliados, é possível chegar a diferentes conclusões quanto à existência de uma ou mais espécies. Para evitar os conflitos gerados a partir de conceitos alternativos de espécie, muitos pesquisadores usam as espécies como sendo linhagens de populações ou metapopulações que evoluem de forma independente (De Queiroz, 2007; Padial *et al.*, 2010). No presente trabalho, a análise de diferentes caracteres propostos pela taxonomia integrativa utilizada nos mesmos indivíduos pôde fornecer maior confiabilidade e minimizar a subestimação da biodiversidade, reconhecendo as quatro OTUs sinonimizadas como espécies válidas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio) por autorizar a captura dos exemplares de peixes (licença número: SISBIO 10522-1). Agradecemos também à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) pelo suporte logístico.

REFERÊNCIAS

Barletta M, Jaureguizar AJ, Baigun C, Fontoura NF, Agostinho AA, Almeida-Val VMF, Val AL, Torres RA, Jimenes-Segura LF, Giarrizzo T, Fabré NN, Batista VS,

Lasso C, Taphorn DC, Costa MF, Chaves PT, Vieira JP, Corrêa MFM. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*. 2010; 76:2118-2176.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02684.x>

Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. 1986; 28:153-159. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05153.x>

Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. Direct Chromosome Preparation From Freshwater Teleost Fishes, *Fish Cytogenetic Techniques*. 2015;1-6.

<https://doi.org/10.1201/b18534-4>

Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C, Hannern R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the Sao Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*. 2011; 22:80-86.

<https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588214>

Cioff MB, Moreira-Filho O, Ráb P, Sember A, Molina WF, Bertollo LAC. Conventional Cytogenetic Approaches - Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. *Current Genetic Medicine Reports* 2018; 6:176-186.

<https://doi.org/10.1007/s40142-018-0148-7>

Costa-Silva GJ, Rodriguez MS, Roxo FF, Foresti F, Oliveira C. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. *PLoS One*. 2015; 10:e0135075.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135075>

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 2012; 9:772.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Dayrat B. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2005; 85:407-415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>

De Queiroz K. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. 2007; 56:879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32:1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Eigenmann CH. American Characidae [Part 1]. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*. 1917; 43:1–102.

Eigenmann CH. The American Characidae [Part 3]. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*. 1921; 43:209–310.

Fink WL, Weitzman SH. The so-called Cheirodontin fishes of Central America with descriptions of two new species (Pisces: Characidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*. 1974; 172:1-46. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.172>

Foresti F. Brief history of fish genetics in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2008; 31:385-388. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200038>

Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD. (Eds). Eschmeyer’s catalog of fishes: genera/species by family/subfamily. Eletronic version. 2021. Available from: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
Access in: 08 August. 2022.

Gavazzoni M, Paiz LM, Oliveira CAM, Pavanelli CS, Graça WJ, Margarido VP. Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. *Zebrafish*. 2018; 15:382–88. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1574>

Gavazzoni M, Pavanelli CS, Graça WJ, Melo BF, Gubiani EA, Margarido VP. Detection of natural hybridization and delimitation of two closely related operational taxonomic units of the *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) complex through integrative

approaches. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2020; 129:687-700.
<https://doi.org/10.1093/biolinnea/blz199>

Griffiths SP. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology*. 2000; 57:1453–1464.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02224.x>

Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41:95-98.

Hatanaka T, Galetti-Jr PM. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*. 2004; 122:239–244. <https://doi.org/10.1007/s10709-004-2039-y>

Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 -step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–1015
<https://doi.org/10.1007/BF01953855>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010; 54:498–511.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.026>

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52:201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA. Genera Incertae Sedis in Characidae. In:

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr, editors. Check List of the Freshwater Fishes of the South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p.106-69.

Lucena CAS, Soares HG. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. Zootaxa. 2016; 4072:101–25. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. Biotechnic & Histochemistry. 2012; 87:433–438. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.696700>

Margarido VP, Moreira-Filho O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). Genetics and Molecular Biology. 2008; 31:235-238. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200012>

Martins C, Galetti-Junior PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Research 1999; 7:363–67. <https://doi.org/10.1023/A:1009216030316>

Melo BF, Dorini BF, Foresti F, Oliveira C. Little divergence among mitochondrial lineages of *Prochilodus* (Teleostei, Characiformes). Frontiers in Genetics. 2018; 9:107. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00107>

Mirande JM. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). Cladistics 2009; 25:574–613. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2009.00262.x>

Mirande JM. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. Neotropical Ichthyology. 8; 2010:385–568. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252010000300001>

Mirande JM. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). Cladistics. 2018; 35(3):282-300. <http://doi.org/10.1111/cla.12345>

Mirande JM. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*. 2019; 35:282–300. <https://doi.org/10.1111/cla.12345>

Nelson JS, Grande TC, Wilson, MVH. *Fishes of the world*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016. p.752.

Oliveira C, Avelino GS, Abel KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Corrêa e Castro RM. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology*. 2011; 11:1-25. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-275>

Ornelas-García CP, Domínguez-Domínguez O, Doadrio I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*. 2008; 8:340. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>

Padial JM, Miralles A, De-la-Riva I, Vences M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 2010; 7:1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>

Pazza R, Cruvinel LA, Kavalco KF. Parallel evolution evidenced by molecular data in the banded-tetra (*Astyanax fasciatus*). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2017; 70:141-146. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.10.024>

Pereira LHG, Pazian MF, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paran a basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*. 2011; 22:87-96. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588213>

Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*. 2013; 14:20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986; 83:2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>

Pires AC, Marinoni L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. Biota Neotropica. 2010; 10:339-346. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology. 2012; 21:1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>

Ramirez JL, Galetti Jr. PM. DNA Barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2015; 93:77-82. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.021>

Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. Fish biodiversity and conservation in South America. Journal of Fish Biology. 2016; 89:12-47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>

Rocha RH, Fernandes CA, Bignotto TS, Margarido VP, Tencatt LFC, Graça WJ, Gubiani EA. Integrated analysis reveals a new species of *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) in the lower Iguassu River, Brazil. Organisms, Diversity, & Evolution. 2022; 22:457-474. <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00534-8>

Rosa RS, FCT Lima. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: ABM Machado, GM Drummond, AP Paglia (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1st.ed. Vol. II. Brasília, DF: MMA, Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. 2008. p. 8-285.

Rossini BC, Oliveira CAM, Melo FAG, Bertaco VA, Díaz de Astarloa JM, Rosso JJ, Foresti F, Oliveira C. Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. PLoS ONE. 2016; 11(12):e0167203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167203>

Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. Annual Review of Entomology. 2010; 55:421-438. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085432>

Schmitter-Soto JJ. A phylogeny of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) in Central and North America. Zootaxa. 2016; 4109:101–130. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4109.2.1>

Strauss RE, Bookstein F. The Truss: Body form reconstructions in morphometrics. Systematic Zoology. 1982; 31:113-135. <https://doi.org/10.2307/2413032>

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research. 1972; 75:304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)

Terán GE, Benitez MF, Mirande JM. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). Zoological Journal of Linnaean Society. 2020; 190:1217-1234. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa019>

Xia X. DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. Molecular Biology and Evolution. 2018; 35:1550-1552. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy073>

Yano CF, LAC B, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi MB. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). Heredity. 2017; 118:276–8. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.83>

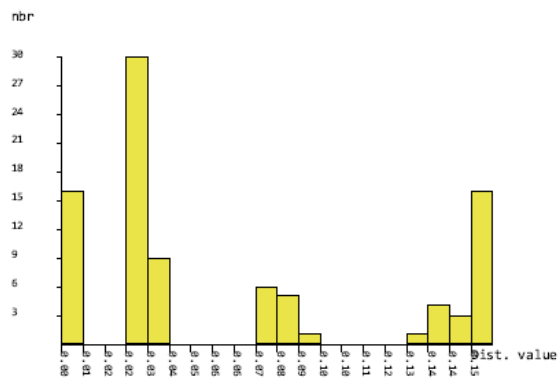
Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions B*. 2005; 360:1847-1857.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>

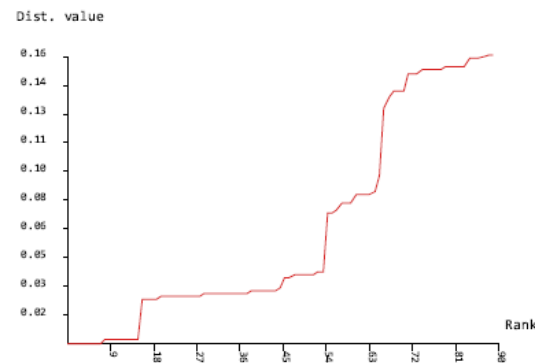
ABGD Web results using K80 Kimura measure of distance Left/right click [here](#) to save matrix distance file

Data: Seq grupo bimaculatus COI final.fas

Histogram of distances [\[save\]](#)



Ranked distances [\[save\]](#)



A Click on a symbol will open a new tab/window showing the selected partition

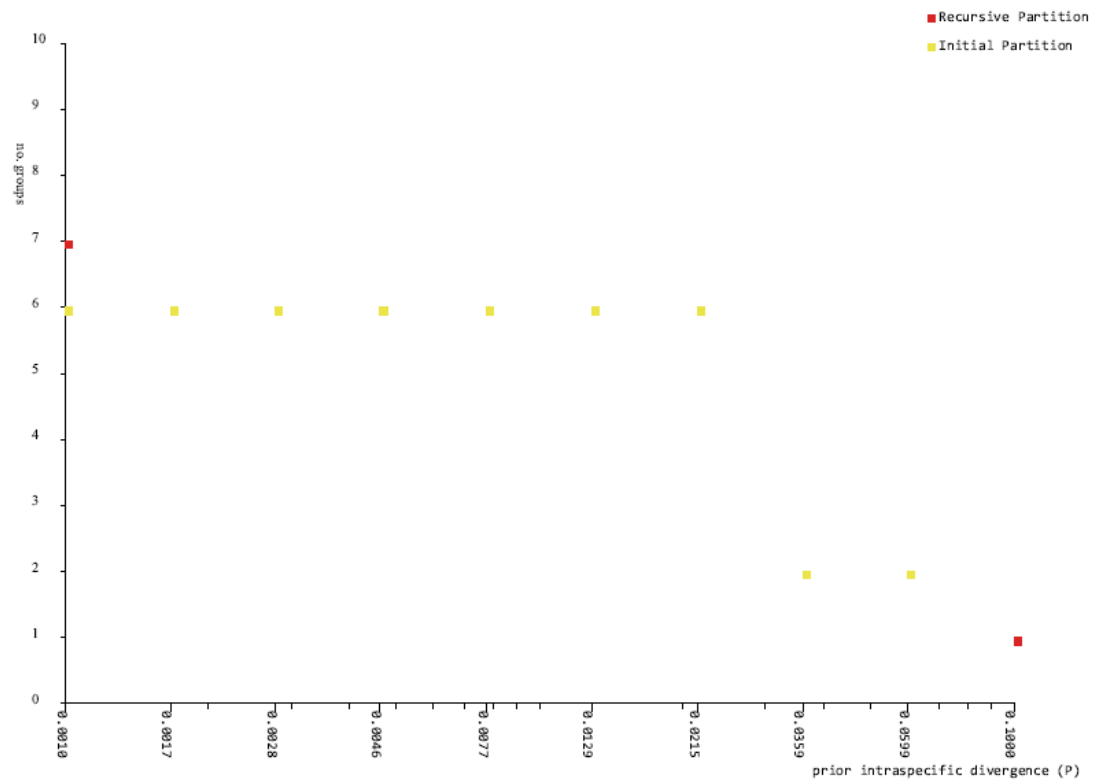


Figura suplementar. Resultado da delimitação das espécies utilizando o modelo ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) com o modelo de distância Kimura (K80).