



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade e estruturação genética do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus*  
(Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

Crislaine Barbosa

Orientadora: Dra. Lizandra Jaqueline Robe

Co-orientadora: Msc. Daiana Kaster Garcez

Monografia apresentada como requisito  
da Disciplina de Trabalho de Graduação  
II - 15125 - do Curso de Bacharelado  
em Ciências Biológicas.

Novembro/2016

## Agradecimentos

Aos meus pais, Luiz Carlos e Clarice, por todo o amor e carinho, por tudo que me ensinaram, por serem meus melhores amigos e por estarem sempre presentes apesar da distância. Serei eternamente grata por me incentivarem a trilhar meu próprio caminho.

À minha orientadora Lizandra Robe, pela oportunidade, paciência, pelos inúmeros ensinamentos e por toda a confiança em mim depositada. Graças a você eu encontrei meu lugar nesse fascinante mundo da ciência.

À minha co-orientadora Daiana Kaster Garcez, pela ajuda essencial na realização desse projeto, pela amizade e, principalmente, por ter me apresentado os amados peixes anuais.

Aos colegas do Laboratório de Genética pela companhia e apoio de sempre.

Aos técnicos do Laboratório de Genética que em algum momento contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

À Giselle Perazzo pela imensa ajuda com a morfometria.

Aos familiares e amigos que deixei em Caxias do Sul, por todo o apoio e amor que me transmitiram apesar da distância.

Ao meu tio Luiz Antonio (*in memorian*), por todos os ensinamentos que me deu em vida. Sua lembrança foi minha fonte de incentivo todas as vezes que pensei em desistir e se não fosse por você, creio que eu não chegaria até aqui.

Aos amigos que a biologia me trouxe, Cíntia, Fernanda, Mateus e William, por estarem ao meu lado nos momentos alegres e também nos mais difíceis, por todas as bagunças, risadas, almoços... enfim, por terem se tornado minha família em Rio Grande.

À FURG e ao ICB, por permitir a realização desse trabalho.

Ao CNPq, pelas bolsas concedidas que possibilitaram diversas conquistas.

Ao Garfield e ao Felix, pelo amor incondicional e pela companhia em todos os momentos, principalmente nas noites de estudo.

## Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	02
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	05
<b>Resumo</b> .....	06
<b>Abstract</b> .....	08
<b>Introdução Geral</b> .....	10
Os peixes-anuais.....	10
<i>Austrolebias</i> .....	14
<b>Manuscrito: Evidences for genetic and morphometric differentiation within the highly endemic and endangered annual fish <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> (Cyprinodontiformes: Rivulidae)</b> .....	19
<b>Abstract</b> .....	20
<b>Introduction</b> .....	22
<b>Materials and methods</b> .....	24
Samplings.....	24
Molecular procedures and analyses.....	24
Morphometric analysis.....	26
<b>Results</b> .....	27
<b>Discussion</b> .....	29
<b>References</b> .....	33
<b>Tables</b> .....	40
<b>Figure captions</b> .....	41
<b>Figures and appendices</b> .....	42
<b>Considerações Finais</b> .....	47
<b>Bibliografia</b> .....	50

## Lista de abreviaturas

COI - citocromo c oxidase subunidade I

CVA - Canonical Variate Analysis

cytb - citocromo b

ESS - Effective Sample Size

GPA - Generalized Procrustes Analysis

Hd - Diversidade haplotípica

K2P - Kimura 2-parâmetros

MCMC - Markov Chain Monte Carlo

mya - million years ago

NJ - Neighbor-Joining algorithm

pb - pares de base

PCA - Principal Component Analysis

PCR - Polymerase Chain Reaction

UPGMA - Unweighted Pair Group Method

TMRCA – time to the most recent common ancestor

## **Diversidade e estruturação genética do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus***

### **(Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

Os peixes anuais do gênero *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) constituem um grupo monofilético que habita ambientes aquáticos que secam sazonalmente. Para viverem em ambientes com condições extremas, estes peixes apresentam muitas adaptações, como ciclo de vida curto, capacidade de diapausa e altas taxas metabólicas. Tais peculiaridades os tornam extremamente dependentes de seu biótopo, e a degradação de seu habitat está colocando muitas espécies sob ameaça de extinção. Além disso, por constituírem populações pequenas e isoladas, estas espécies costumam estar sujeitas a altas taxas de deriva genética, endogamia e a baixos níveis de fluxo gênico, o que tende a aumentar a vulnerabilidade destas espécies. *Austrolebias nigrofasciatus* é uma das espécies deste gênero que se encontra, atualmente, ameaçada de extinção. Esta espécie é endêmica do sistema de drenagens Patos-Mirim, onde apresenta uma distribuição restrita à cidade de Pelotas e arredores, no Rio Grande do Sul. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade e os níveis de estruturação genética e morfológica entre populações de *A. nigrofasciatus*, de modo a fornecer informações para elaborar estratégias corretas de preservação. Assim, espécimes foram coletados em cinco charcos isolados situados nas cidades de Pelotas e Capão do Leão, sendo coletados cerca de 20 indivíduos por charco. Em laboratório, foi realizada a extração do DNA genômico total destes espécimes, ao que se seguiu a amplificação de fragmentos dos genes mitocondriais citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo b (cytb) através de PCR. Os amplicons obtidos foram purificados e sequenciados. As informações contidas na matriz de sequências alinhadas foram avaliadas pelo uso de métodos filogenéticos e de distância, através dos programas MEGA 6.0, Network 4.510, DnaSP 5.10, Arlequin 3.5 e BEAST 1.8. Para as análises de

morfometria geométrica, 76 peixes foram fotografados e 10 landmarks foram marcados em cada indivíduo através do programa tpsDig 232. Por meio do software MorphoJ foi realizada uma análise de variáveis canônicas (CVA), além da estimativa das distâncias de Mahalanobis, ao que se seguiu a construção de um dendrograma por UPGMA. Foram recuperados altos níveis de diversidade haplotípica e baixos de diversidade nucleotídica para ambos os marcadores dentro de cada população, além de valores moderados a altos de estruturação entre populações. Além disso, a morfometria apontou a presença de diferenciação morfológica entre os machos de diferentes populações. Os resultados obtidos indicam que há moderada estruturação entre as populações, seguindo um padrão de diferenciação por distância, ainda que a espécie apresente uma distribuição bastante restrita. Além disso, duas populações apresentaram valores muito baixos de diversidade genética, indicando a urgência de medidas de intervenção, de modo a garantir a preservação da espécie.

**Palavras-chave:** genética de populações; killifish anual; morfometria geométrica; sistema de drenagens Patos-Mirim.

## **Genetic diversity and structure of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus***

### **(Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

*Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) constitutes a monophyletic group which inhabits isolated aquatic environments which dry seasonally. To live in extreme environments, these fish have many adaptations such as a short life cycle, diapause capacity and high metabolic rates. These peculiarities make them extremely dependent on their biotope, and the degradation of their habitats is placing many species under threat of extinction. Moreover, as these species commonly constitute small and isolated populations, they are often subject to high rates of genetic drift, inbreeding and low levels of gene flow, which tends to increase their vulnerability. *Austrolebias nigrofasciatus* is one species of *Austrolebias* that is currently considered as “Endangered”. This species is endemic to the Patos-Mirim drainage system, where it presents a distribution restricted to the municipality area of Pelotas and surroundings, in the state of Rio Grande do Sul. This study aimed to evaluate the genetic and morphological diversity and structure levels presented between populations of *A. nigrofasciatus*, in order to provide information to develop correct conservation strategies. Therefore, specimens were collected in five isolated ponds located in the municipalities of Pelotas and Capão do Leão, being collected approximately 20 individuals per sampling location. In laboratory, total genomic DNA was extracted from each individual, which was followed by the amplification of fragments of the mitochondrial genes cytochrome c oxidase (COI) and cytochrome b (cyt b) by PCR. The amplified fragments were then purified and sequenced. Information contained in the array of aligned sequences were evaluated using phylogenetic methods and distance through the software MEGA 6.0, Network 4.510, DnaSP 5.10 Arlequin 3.5 and BEAST 1.8. For the geometric morphometry, a picture was taken from each of 76 fishes and 10 landmarks were defined in each individual in the software tpsDig 232. By the software MorphoJ a



canonical variate analysis (CVA) was performed and Mahalanobis distances were estimated, which was followed by the construction of an UPGMA dendrogram. High levels of haplotype diversity were obtained for both molecular markers, and these were associated with low levels of intrapopulation nucleotide diversity, and with moderate to high levels of interpopulation structure. Besides, morphometry showed the presence of morphological differentiation between males collected at different populations. The results indicate a moderate structure between populations, following a pattern of isolation by distance, even that the target species presents a very restricted distribution. In addition, two populations presented very low levels of genetic variability, indicating the need of urgent interventions, in order to ensure the preservation of the species.

**Key-words:** population genetics; annual killifish; geometric morphometry; Patos-Mirim drainage system.

## Introdução Geral

### Os peixes-anuais

A subordem Aplocheiloidei divide-se em três famílias: Aplocheilidae, Nothobranchiidae e Rivulidae<sup>1</sup> (Parenti, 1981; Murphy e Collier, 1997). Estas três famílias apresentam distribuições geográficas distintas e não sobrepostas, sendo Aplocheilidae endêmica de Madagascar, Seychelles, Índia, Paquistão e Vietnã; Nothobranchiidae endêmica da África sub-saariana; e Rivulidae endêmica da América do Sul, Central e sul da América do Norte (Costa, 2006; Loureiro e de Sá, 2015). Nothobranchiidae e Rivulidae compartilham características ecológicas, fisiológicas e biológicas, que levaram ao seu agrupamento junto à superfamília Nothobranchioidea. Estas famílias são, pois, consideradas grupos irmãos, cuja divergência se mostra congruente à abertura do norte do Atlântico Sul, há 110 milhões de anos (Costa, 1998; Sanmartin e Ronquist, 2004; Costa, 2013).

A família Rivulidae compreende 38 gêneros e aproximadamente 428 espécies descritas (Eschmeyer & Fong, 2016), constituindo a quarta família mais diversa entre os peixes neotropicais de água doce. Parenti (1981) foi o primeiro a sugerir a monofilia de Rivulidae, e esta hipótese foi, posteriormente, confirmada por diversos pesquisadores por meio de análises morfológicas e moleculares (Costa, 1990; Murphy e Collier, 1997; Costa, 1998). Segundo Murphy e Collier (1997), os rivulídeos podem ser divididos em duas linhagens: Cynolebiasinae e Rivulinae. A primeira compreende aproximadamente nove gêneros, incluindo os grupos irmãos *Campellolebias*, *Leptolebias* e *Cynopoecilus*; os

---

<sup>1</sup> O nome desta família tem sido alvo de controvérsias desde a descoberta de um grupo de lepidópteros em que a raiz Rivul- já era utilizada (van der Laan et al., 2014). Embora Costa (2016) tenha incluído “Rivulidae” dentro de Aplocheilidae, outros autores tem mantido a subdivisão em três famílias, com os rivulídeos incluídos em Cynolebiidae (Eschmeyer e Fong, 2016). Como este é um debate recente, que ainda não atingiu um consenso, preferiu-se manter a nomenclatura Rivulidae ao longo desta monografia.

grupos irmãos *Nematolebias*, *Simpsonichthys* e *Austrolebias*; e o gênero *Spectrolebias* (Costa, 1998).

Os rivulídeos distribuem-se ao longo da América do Sul e Central até o sul da América do Norte (Costa, 2008). Na América Central, ocorrem entre o centro do México e Panamá, e ao longo das drenagens do Pacífico na Costa Rica e Panamá. Algumas espécies são endêmicas das Ilhas do Caribe, e táxons tolerantes à água salgada são encontrados da América do Norte à América do Sul. Na América do Sul, a família é amplamente distribuída na maioria das bacias hidrográficas cis-andinas, do norte da Venezuela até o sul da Argentina, no Brasil e nas drenagens atlânticas trans-andinas da Colômbia e da Venezuela, com algumas ocorrências na bacia costeira do Pacífico no nordeste da Colômbia (Costa, 1998; Costa, 2010). Cerca de um terço das espécies de rivulídeos é encontrada em águas brasileiras, com no mínimo 37 espécies conhecidas para o estado do Rio Grande do Sul. Dentre estas, 31 pertencem ao gênero *Austrolebias* (Costa, 2008; Volcan *et al.*, 2015).

Cerca da metade das espécies de rivulídeos são encontradas em áreas alagadas temporárias que se formam durante períodos de cheias e secam durante alguns meses do ano. Por viverem em ambientes efêmeros, que apresentam condições físico-químicas muito variáveis, como grande amplitude térmica, estresse hídrico, e baixos níveis de oxigênio, estas espécies apresentam uma série de adaptações características, que permitem sua sobrevivência (Volcan, 2009). Neste sentido, muitos rivulídeos apresentam um ciclo de vida curto, que pode se completar em alguns meses, sendo popularmente conhecidos como peixes anuais (Murphy *et al.*, 1999; García *et al.*, 2002; Costa, 2010; Volcan *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014). Estes peixes se desenvolvem rapidamente durante o período chuvoso, atingindo a maturidade sexual precocemente, em cerca de 6 a 8 semanas; apresentam reprodução contínua e depositam os ovos no substrato em profundidades de até 15 cm

(Vaz-Ferreira *et al.*, 1966). Nos períodos de seca, os charcos secam e os adultos morrem, enquanto os ovos entram em estágio de diapausa, havendo uma pausa temporária no desenvolvimento embrionário. A eclosão dos ovos ocorre somente na próxima estação chuvosa, reiniciando o ciclo (Murphy e Collier, 1997; Podrabsky e Hand, 1999; Costa, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014).

Como o anualismo é visto tanto em Rivulidae quanto em Notobranchiidae, alguns pesquisadores o consideram uma sinapomorfia deste par de famílias irmãs, embora outros defendam que o mesmo reflita uma homoplasia entre as famílias (Murphy e Collier, 1997; Costa, 1998). De acordo com Murphy e Collier (1997), o ciclo de vida anual, incluindo os ovos com a capacidade de diapausa, é uma característica muito complexa, de modo que seu surgimento em dois momentos distintos parece improvável. Em contrapartida, Costa (1998) afirma que o anualismo é uma homoplasia indicativa de convergência adaptativa entre Rivulidae e Nothobranchiidae. Segundo o mesmo autor, o anualismo representa uma característica ancestral para Rivulidae, sendo o não anualismo encontrado em algumas espécies decorrente de uma perda derivada do processo de diapausa. Esta hipótese vem sendo confirmada por análises moleculares sobre a evolução do mecanismo de diapausa, as quais indicam que o sistema de desenvolvimento dos rivulídeos pode favorecer a evolução convergente desta propriedade entre habitats diferentes, uma vez que os indivíduos sofram a mesma pressão imposta pelo ambiente (Furness, 2015).

Todas estas peculiaridades tornam os representantes de Rivulidae ótimos modelos para estudos bioecológicos no que tange à plasticidade fenotípica, tolerância fisiológica e adaptação a ambientes extremos (Furness, 2015). Além disso, o seu ciclo de vida único e suas adaptações relacionadas à reprodução os tornam ótimos modelos para estudos evolutivos. A peculiar distribuição das espécies, que constituem populações pequenas e isoladas, instaura um cenário natural ideal para análises de mecanismos evolutivos como

deriva genética e efeito fundador. A elevada atuação destes mecanismos evolutivos, acrescida à grande dificuldade de fluxo gênico entre as populações, tende a elevar os níveis de endogamia e de estruturação genética. Além disso, estes mecanismos tendem a reduzir a diversidade genética, o que pode reduzir o fitness reprodutivo da espécie e limitar sua capacidade de adaptação. Em conjunto, estes mecanismos aumentam a divergência entre as populações, podendo levar a diferenciação morfológica e, em alguns casos, culminar em eventos de especiação alopátrica (Loureiro, 2004; Futuyma, 2009; Matioli e Fernandes, 2012; de Sá *et al.*, 2015; Beheregaray *et al.*, 2016).

No entanto, as mesmas peculiaridades que possibilitam a sobrevivência dos peixes-  
anuais em ambientes hostis os tornam extremamente dependentes da integridade física de seu biótopo (Volcan, 2009). A restrita área de distribuição dos peixes anuais e seu ciclo de vida característico, aliados ao avançado grau de degradação das áreas úmidas, devido principalmente às atividades agrícolas, como a rizicultura, e à urbanização, fazem com que esse grupo seja considerado um dos grupos de vertebrados mais ameaçados do Brasil. No Rio Grande do Sul, estima-se que 39% de toda a ictiofauna sob risco de extinção seja composta por rivulídeos, que compreendem ainda 70% das espécies de peixes de água doce ameaçadas de extinção (Rosa e Lima, 2008; ICMBio, 2014; SEMA, 2014). No entanto, faltam dados sobre distribuição e informações ecológicas de várias espécies, o que dificulta o planejamento de estratégias de conservação (Lanés, 2011). Em frente a esta situação foi elaborado, no Brasil, o “Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção – PAN Rivulídeos”, que tem como objetivo estabelecer mecanismos de proteção aos rivulídeos e anular a perda de habitat das espécies em foco. Este documento ressalta a importância da realização de estudos técnicos e científicos, bem como sua aplicação à conservação das espécies de Rivulidae (ICMBio, 2014). Neste contexto, diversos autores defendem a realização de estudos sobre estes

peixes a fim de serem obtidas mais informações que auxiliem na preservação dos mesmos (Reis *et al.*, 2003; Rosa e Lima, 2008; Volcan *et al.*, 2009).

### ***Austrolebias***

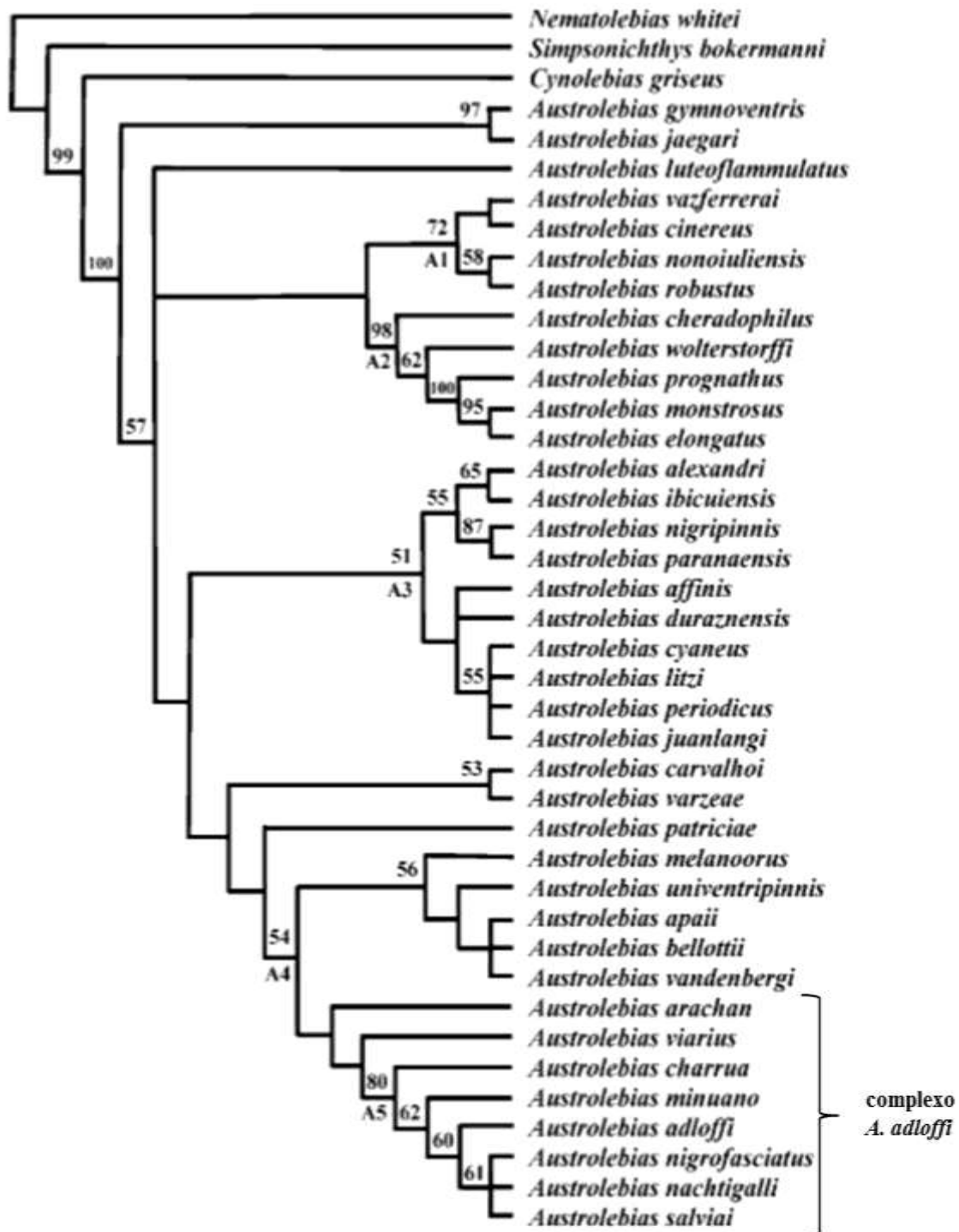
*Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) compreende cerca de 43 espécies de peixes-anaís, cuja distribuição se estende pelo sul do Brasil, Paraguai, sul da Bolívia, Uruguai e norte e nordeste da Argentina, dentro da área que constitui o sistema dos rios Paraná-Paraguai-Uruguai, junto de algumas espécies que ocorrem na Bacia Amazônica (Costa, 1998; Nielsen e Pillet, 2015). Trata-se de um gênero monofilético, cujo status é suportado tanto por análises morfológicas (Costa, 2006) quanto por análises moleculares (García *et al.*, 2000; García, 2006). Morfologicamente, as sinapomorfias que comprovam a monofilia de *Austrolebias* são: ausência de escamas entre o canto da boca e a porção anterior da região pré-opercular, osso urial alto, presença de mancha supra-orbital cinza a negra, nadadeiras dorsal e anal arredondadas em machos, papila urogenital alongada em machos e processo ventral de ângulo-articular reduzido (Costa, 2006).

Contrastando com outras espécies de Aplocheiloidei que estão geograficamente restritas a áreas quentes tropicais, muitas espécies de *Austrolebias* são endêmicas de áreas temperadas da América do Sul, onde as épocas chuvosas estão concentradas nos meses de inverno, sendo, conseqüentemente, encontrados em águas frias (Costa, 2006). Nestes locais, as espécies de *Austrolebias* são muito importantes para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, devido à sua abundância e ao seu hábito alimentar oportunista, cujo principal recurso parece ser constituído de invertebrados (Volcan *et al.*, 2011). No que diz respeito às suas características moleculares, sabe-se que as espécies de *Austrolebias* apresentam uma taxa relativamente elevada de substituição de bases em seus genomas mitocondriais, além de um padrão diferenciado de substituições de aminoácidos em alguns genes *Hox* (García *et al.*, 2000; García *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2007).

Quanto às relações filogenéticas dentro do gênero, as topologias de árvores variam em função do conjunto de dados utilizados, de modo que a filogenia do grupo permanece instável. Apesar disso, a monofilia de alguns clados dentro do gênero é bem suportada (Costa, 2006; Costa, 2010; García *et al.*, 2014). Neste sentido, *Austrolebias* apresenta cinco grupos de espécies, nomeados de acordo com a identidade de sua primeira espécie descrita (*A. robustus*, *A. elongatus*, *A. alexandri*, *A. bellottii* e *A. adloffii*), além de três espécies basais (*A. luteoflammulatus*, *A. gymnoventris* e *A. jaegari*) (Costa, 1998; Loureiro, 2004; Costa, 2006; García, 2006) (Fig. I). É interessante observar que, dentro de cada um destes grupos, os subclados apresentam uma distribuição predominantemente alopátrica, o que corrobora com a ideia de especiação alopátrica (Loureiro *et al.*, 2015). Embora esta subdivisão venha sendo confirmada por análises moleculares (García *et al.*, 2000; García, 2006), evidências recentes apresentam *A. gymnoventris* e *A. luteoflammulatus* como espécies derivadas, e suportam a divisão de *Austrolebias* em cinco complexos de espécies que constituem dois clados fortemente diferenciados (García *et al.*, 2014). Neste caso, o primeiro clado inclui o complexo de espécies *A. alexandri-affinis*, enquanto o segundo clado inclui os outros quatro complexos de espécies (*A. bellottii-robustus*, *A. gymnoventris-luteoflammulatus-quirogai*, *A. elongatus* e *A. adloffii-viarius*), apresentados como uma politomia basal.

Este grupo inclui nove espécies (*A. charrua*, *A. minuano*, *A. adloffii*, *A. nigrofasciatus*, *A. arachan*, *A. viarius*, *A. juanlangui*, *A. bagual* e *A. reicherti*), distribuídas ao longo do sistema lagunar Patos-Mirim (Costa, 2006; García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2015). O que caracteriza este grupo e o diferencia dos demais representantes de *Austrolebias* é seu distinto padrão de cor na porção posterior do pedúnculo caudal, encontrado em fêmeas jovens e adultas e, às vezes, também em machos adultos, que

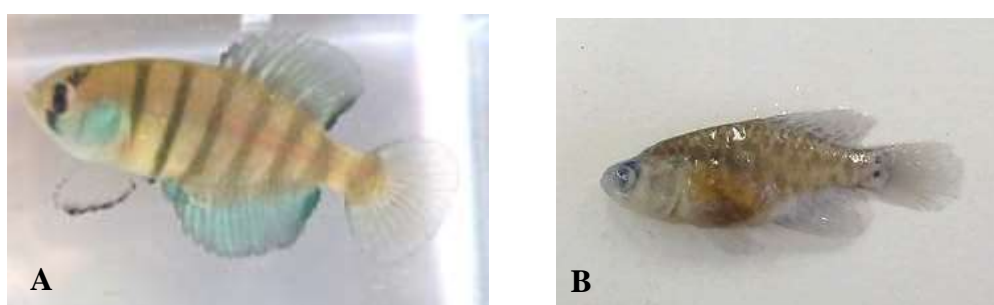
consiste em um par de pontos negros verticalmente dispostos, podendo se unir para formar uma mancha em forma de oito (Costa, 2006; García *et al.*, 2009).



**Figura I** - Árvore de consenso estrito entre dois cladogramas de máxima parcimônia obtidos para diferentes espécies de *Austrolebias* com base na análise de caracteres morfológicos, com o posicionamento do complexo de espécies *A. adloffii* em destaque. Retirado de Costa (2006).



*Austrolebias nigrofasciatus* Costa e Cheffe, 2001, é uma espécie de pequeno porte pertencente ao grupo *A. adloffii* e distribuída por áreas úmidas no extremo sul do Brasil (Costa, 2006; Volcan, 2009), onde é encontrada em charcos temporários associados à região de várzea do Rio Piratini e à margem direita do canal São Gonçalo, pertencente ao sistema lagunar Patos-Mirim, no Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Esta espécie se distingue das demais espécies do grupo pela combinação das seguintes características: origem da nadadeira dorsal geralmente anterior à origem da nadadeira anal em machos e fêmeas; 21-26 raios na nadadeira anal em machos e 18-23 nas fêmeas; 19-22 raios na nadadeira caudal; uma ampla barra preta na região posterior das barbatanas dorsais; e bases da nadadeira anal com barras azuis (Costa, 2006). Esta espécie apresenta marcado dimorfismo sexual (Fig. II), com machos de padrão colorido composto por faixas azul claro com 6-12 barras marrom escuro a pretas e fêmeas com corpo marrom amarelado, com linhas verticais de pontos cinzentos, às vezes formando barras cinza (Costa, 2006; Volcan *et al.*, 2009). Como *A. nigrofasciatus* apresenta uma área de distribuição restrita e baixa plasticidade ecológica, a mesma encontra-se atualmente na Lista de Fauna Ameaçada de Extinção, na categoria “Em Perigo” (ICMBio, 2014).



**Figura II** - Dimorfismo sexual em *A. nigrofasciatus*: (A) macho, (B) fêmea.

Devido às peculiaridades características dos peixes-anuais, aliadas à distribuição restrita e a ameaça de extinção de *A. nigrofasciatus*, muitos pesquisadores sugerem a realização de estudos sobre a espécie (Rosa e Lima, 2008; Volcan *et al.*, 2009; Volcan *et*

*al.*, 2010). O uso de técnicas moleculares no estudo da diversidade e estruturação populacional tem se mostrado muito eficiente na obtenção de informações tendo em vista a conservação das espécies. Através da estimativa da estruturação populacional, por exemplo, pode ser feito um melhor direcionamento dos esforços de conservação, visando um uso mais eficiente dos recursos disponíveis (Matioli e Fernandes, 2012; Beheregaray *et al.*, 2016). Além disso, os níveis de diversidade genética apresentados pelas diferentes populações fornecem estimativas importantes acerca do grau de perturbação do seu biótopo, e da sua própria evolvibilidade (Matioli e Fernandes, 2012).

Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar os padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica da espécie alvo ao longo de sua área de distribuição, que compreende charcos potencialmente isolados entre si localizados nas cidades de Pelotas e Capão do Leão, RS. Mediante a análise da diversidade e estruturação genética combinados com a avaliação da diferenciação morfométrica, e com a reconstrução da história evolutiva associada à origem e diversificação de *A. nigrofasciatus*, importantes informações sobre a espécie poderão ser obtidas. Estas poderão, futuramente, ser utilizadas na elaboração de estratégias mais eficazes de manejo e conservação, contribuindo para a redução da crise de biodiversidade (Berois *et al.*, 2015), e garantindo a preservação desta espécie e dos rivulídeos em geral.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

**Evidences for genetic and morphometric differentiation within  
the highly endemic and endangered annual fish *Austrolebias  
nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

C. Barbosa\*, D. K. Garcez\*, G. Perazzo\*, M. V. Volcan§, L. J. Robe\*†

\*Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de  
Genética, Av. Itália, km8, s/n, Rio Grande, Brasil §Instituto Pró-Pampa, Laboratório de  
Ictiologia, Rua Uruguai, 1242, CEP 96010-630, Pelotas-RS, Brasil

**Manuscrito a ser submetido para a revista Journal of Fish Biology**

†Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +55 53 32935128; email: lizbiogen@gmail.com

24

## Abstract

25 *Austrolebias nigrofasciatus* is an endangered species of annual fish, endemic to a small  
26 area of the Patos-Mirim lagoon system encompassing the Pelotas city area, in Southern  
27 Brazil, where it occurs in isolated temporary ponds. This study aimed to evaluate the  
28 patterns of genetic and morphometric diversity and differentiation presented within and  
29 between populations of *A. nigrofasciatus*, while assessing their evolutionary history, in  
30 order to guide application of further conservation strategies. Therefore, 85 specimens of  
31 the target species were collected in five isolated temporary ponds. In laboratory, fragments  
32 of the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) and cytochrome b (cyt b) genes were  
33 amplified, purified and sequenced for at least 73 of these individuals, which were then  
34 further analyzed using phylogenetic and phylogeographic software. For geometric  
35 morphometry, 76 fishes were photographed and had the positions of 10 elected landmarks  
36 recorded, with shape variation being further evaluated through canonical variate analysis  
37 (CVA) and Mahalanobis distances. According to our molecular data, the origin and  
38 diversification of *A. nigrofasciatus* seems to have happened in the Pleistocene, at  
39 approximately 0.3 Mya, starting next to the São Gonçalo channel in association with  
40 regressive events. Despite the small geographical distance presented by the populations  
41 (maximum of 42 km), most of them presented moderated to strong genetic differentiation,  
42 and even distinguishable morphological patterns, at least when males are concerned. The  
43 predominance of exclusive haplotypes, and the inference of several missing haplotypes in  
44 the network analysis evidences the strong influence of random genetic drift in each of these  
45 populations, and this phenomenon seems to have been enhanced in the areas closer to  
46 urban settlements, with the populations located within the city of Pelotas showing lower  
47 levels of genetic diversity. Taken together, the results highlight the urgent need of adoption

48 of independent conservation strategies, with each population treated as an individual  
49 management unit.

50 **Key words:** killifish, Patos-Mirim lagoon system, genetic diversity, endangered species.

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

## INTRODUCTION

70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93

Rivulidae comprises 38 genera and approximately 428 valid killifish species (Eschmeyer & Fong, 2016), which occur throughout South America up to southern North America (Costa, 2006). Parenti (1981) argues that Rivulidae is a monophyletic group, and this hypothesis has been later confirmed by morphological and molecular analyses (Murphy & Collier, 1997; Costa, 1998). About half of the killifish species are found in isolated and temporary wetlands which regularly dry and flood, according to the precipitation/evapotranspiration ratios. Since these fish must complete their life cycle in only a few months, they share a set of peculiar adaptations, and are popularly known as annual fish (Murphy *et al.*, 1999; Volcan, 2009; Volcan *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014). These fish grow up rapidly during the rainy season, when they reproduce continuously, laying eggs in the substrate at depths up to 15 cm (Vaz-Ferreira *et al.*, 1966). As the ponds dry, the adults die and the eggs enter a diapause stage, characterized by a temporary pause in the embryonic development; hatching occurs only in the next rainy season, restarting the cycle (Podrabsky & Hand, 1999; García *et al.*, 2014).

All these characteristics make the killifish great models for bio-ecological and evolutionary studies (Furness, 2015). However, the same peculiarities that enable their survival in extreme environments make them highly dependent on the physical integrity of their biotope (Volcan, 2009). The restricted area of distribution of these fish and their characteristic life cycle, combined with the advanced degradation of wetlands, makes this one of the most threatened groups on Brazil (Brasil, 2014). Such a circumstance is even worsened by the fact that killifish usually encompass a reduced number of small and isolated populations, with reduced effective population sizes, which are subject of high

94 levels of genetic drift and inbreeding and low levels of gene flow. Together, these  
95 mechanisms increase the divergence between populations, leading to cases of allopatric  
96 speciation (Loureiro, 2004; Futuyma, 2009; Matioli & Fernandes, 2012), and urging even  
97 more the adoption of specific conservation strategies.

98 *Austrolebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe is a small (up to 5 cm) sexually  
99 dimorphic annual fish that encompasses one of the nine species of the *A. adloffii* species  
100 group, together with *A. adloffii*, *A. minuano*, *A. charrua*, *A. reicherti*, *A. juanlangi*, *A.*  
101 *arachan*, *A. viarius* and *A. bagual* (Costa, 1998; Loureiro, 2004; García, 2006; Costa,  
102 2006, Volcan *et al.* 2014). This species is distributed in temporary ponds restricted to the  
103 lowlands of the São Gonçalo channel along a stretch of about 40 km, in the cities of  
104 Pelotas and Capão do Leão, Rio Grande do Sul, southern Brazil (Costa, 2006; Volcan,  
105 2009). *Austrolebias nigrofasciatus* is characterized by high levels of endemism, associated  
106 with low ecological plasticity, such that it is currently considered endangered of extinction  
107 (Rio Grande do Sul, 2014; Brasil, 2014).

108 As the knowledge of the patterns of distribution of diversity within different species  
109 is one of the major tasks for the implementation of effective conservation strategies (Rosa  
110 & Lima, 2008; Volcan *et al.*, 2009; Volcan *et al.*, 2010; Matioli & Fernandes, 2012), this  
111 study was designed in order to evaluate the levels of genetic and morphometric  
112 differentiation presented within and between different populations of *A. nigrofasciatus*  
113 along its whole area of distribution. Considering the conditions of this species, results  
114 corroborating the presence of low levels of intrapopulational diversity, associated with  
115 high levels of interpopulational differentiation, would highlight the need of urgently  
116 adopting specific conservation strategies in each of the small number of areas where this  
117 species can be currently found.

118

## MATERIALS AND METHODS

119

120

### Samplings

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

This study includes a total of 85 individuals of *A. nigrofasciatus* collected between 2015 and 2016 in five sampling locations (see appendices) distributed along the known distribution range of this species, that is, Pelotas city and surroundings (Costa, 2006; Volcan *et al.*, 2009). Samplings were performed after obtaining the collecting license by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), under the Brazilian Ministry of Environment, and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Universidade Federal do Rio Grande. The fish were collected in temporary ponds with the help of hand net, euthanized with an overdose of 3000mg/L of eugenol and fixed in absolute ethanol. After that, the individuals were transferred to the Laboratório de Genética, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil where they were dissected.

132

### Molecular procedures and analyses

133

134

135

136

137

138

139

140

141

Total genomic DNA was extracted from muscular tissue, using a phenol/chloroform protocol (Sambrook *et al.*, 1989). This DNA was then employed in the amplification of approximately 800 pb of the mitochondrial cytochrome b (*cyt b*) gene, using L14735 (5'-AAAACCACCGTTGTTATTCAACTA-3') and CB3-H primers (5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3') (Wolf *et al.*, 1999; Palumbi *et al.*, 1991), and approximately 1200 pb of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, using LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and COX1R primers (5'-GGYTCTTCRAARGTGTGATAS-3') (Folmer *et al.*, 1994; Costa & Amorim, 2011). To check whether the amplification was successful, the PCR products were subjected to



142 electrophoresis on 0.8% agarose gel, stained with GelRed (Biotium). The amplified  
143 fragments were then purified with a solution of 7.5M ammonium acetate (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>) and  
144 sequenced. Sequencing was performed in a Perkin-Elmer ABI Prism 377 Automated  
145 Sequencer (MACROGEN, Seoul, Korea), using the same amplification primers.

146 The obtained sequences had their identity confirmed using BLASTN (NCBI  
147 website). The electropherograms were assembled and edited in the Gap4 software of the  
148 Staden package (Staden, 1996). The alignments were performed under the ClustalW  
149 algorithm, as implemented in MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013), and each  
150 polymorphic site encountered along the matrix was individually checked and manually  
151 corrected, if necessary. MEGA 6 was also employed to measure pairwise sequence  
152 divergences and the intrapopulational distances, using the Kimura two-parameters (K2P)  
153 (Kimura, 1980) substitution model.

154 The level of genetic diversity within population was further evaluated using DnaSP  
155 5.10 software (Librado & Rozas, 2009), as estimated from the haplotype (Hd) and  
156 nucleotide ( $\pi$ ) diversities. The same software was also used to check the null hypothesis of  
157 neutrality, through the Tajima's D (Tajima, 1989), Fu & Li's D (Fu & Li, 1993), Fu & Li's  
158 F (Fu & Li, 1993) and Fu's Fs (Fu, 1997) tests.

159 The level of genetic differentiation between populations was measured through Fst  
160 statistics in Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 1993), with significance evaluated through  
161 10000 random permutations. These distances were further employed in the evaluation of  
162 an "isolation by distance" hypothesis, as tested by a Mantel Test performed in the same  
163 software. A Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) (Dupanloup *et al.*, 2002)  
164 was finally executed in order to assess the different hypothesis of population groupings.  
165 The relative spatio-temporal relationships between haplotypes were inferred from

166 haplotype networks generated by median-joining in the Network v.4.510 software (Bandelt  
167 *et al.*, 1999).

168 Further phylogenetic analyses were conducted under Neighbor-Joining (NJ) (Saitou  
169 & Nei, 1987) and Bayesian Analysis (BA), using MEGA 6 and BEAST 1.5.4 (Drummond  
170 *et al.*, 2007), respectively, with the use of the model selected by the BIC in jModelTest  
171 (HKY+G) (Posada, 2008). In both cases, sequences obtained for another Rivulidae species  
172 (*Austrolebias wolterstorffi*) were used as outgroups. The BA performed in BEAST was  
173 also used to estimate the age of the most recent common ancestor (tMRCA) of the sampled  
174 populations of *A. nigrofasciatus*, and the divergence times of the recovered nodes. In this  
175 case, an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock was implemented using an  
176 estimated rate for the mitochondrial genome of 2% per million years (Brown *et al.*, 1979).  
177 The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analysis was run for 50 million generations,  
178 with trees and parameters sampled every 1000 iterations, and burning the 10% initial  
179 results. Results were first visualized in Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013), which allowed to  
180 assess convergence and effective sample size (ESS) values, and the tree obtained was  
181 finally visualized and edited in FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2016).

## 182 **Morphometric analysis**

183 For geometric morphometry, 76 fish (29 males and 47 females) were collected and  
184 photographed on their left side with a digital camera (Olympus VG-120, supermacro  
185 mode). A set of 10 landmarks were then defined (Fig. 1), and these were digitalized using  
186 TpsDig2 software ver.2.26 (Rohlf, 2016). The landmark coordinates were aligned using a  
187 Generalized Procrustes Analysis (GPA) in the MorphoJ software ver.1.06 (Klingenberg,  
188 2011), where non-shape variability (position, rotation and scale) was removed. The aligned  
189 coordinates were finally used as variables in the multivariate statistical analyses performed  
190 by the same software.

191 A principal component analysis (PCA) was first employed to analyze body shape  
192 differences among populations, after which a canonical variate analysis (CVA) and  
193 Mahalanobis distances were used to summarize differences among populations. The  
194 squared Mahalanobis distances were clustered using the Unweighted Pair Group Method  
195 (UPGMA) algorithm, and a dendrogram was constructed through the DendroUPGMA  
196 computational tool (Garcia-Vallve *et al.*, 1999).

197

198

199

## RESULTS

200

201 For the COI gene, sequences spanning 970 bp were characterized for 79  
202 individuals, holding a total of 35 different haplotypes. For cytb, 717 bp were sequenced for  
203 76 individuals, encompassing 19 haplotypes (Table I). As 73 of these individuals presented  
204 sequences for both markers, the concatenated matrix spanned 1687 bp, and presented 43  
205 different haplotypes.

206 Table I shows the results of the diversity and neutrality tests implemented for each  
207 of the sampling locations using both molecular markers individually. In general, the  
208 number of haplotypes per sampling location ranged between 2 (for COI, in Shopping) and  
209 14 (for COI, in Capão do Leão), although the number of collected individuals has varied  
210 less (minimum of 11; maximum of 21). The haplotype diversity values (Hd) were  
211 generally higher than 0.7 for both genes, although the Shopping population has repeatedly  
212 shown smaller values. Although nucleotide diversity values ( $\pi$ ) were generally low, the  
213 populations of Rio Piratini, Capão do Leão and Eliseu Maciel detached again as the more  
214 diverse. In the comparisons between markers, COI had higher values of Hd and  $\pi$  as

215 compared to *cytb*. For almost all locations, the neutrality tests were not statistically  
216 significant ( $p > 0.05$ ), except for the Shopping population, which presented negative values  
217 for Tajima's *D*, Fu and Li's *D* and Fu and Li's *F* in regard to the *cytb* gene sequences.

218 As concerns the *F<sub>st</sub>* values, the only comparisons that were not statistically  
219 significant occurred between Pontal da Barra and Shopping populations, for the two  
220 markers (Table II). In the significant comparisons, for *cytb*, *F<sub>st</sub>* values ranged from 0.12 to  
221 0.26, indicating moderated levels of genetic differentiation. Using COI, the values were  
222 higher than 0.16, ranging from 0.19 to 0.51 in the comparisons involving Rio Piratini and  
223 any of the other four locations.

224 The presence of genetic differentiation between populations and the high haplotype  
225 diversity were also revealed by the haplotype networks, which detached by the  
226 predominance of exclusive haplotypes (Fig. 2). In fact, the number of exclusive haplotypes  
227 was 15 (from 19) and 30 (from 35), for *cytb* and COI, respectively, reaching 40 (from 43)  
228 in the concatenated analysis. Moreover, only *cytb* presented one haplotype which was  
229 shared between all populations. Interestingly, although for COI the Shopping population  
230 presented only two haplotypes, both shared with other populations, *cytb* revealed the  
231 presence of one individual with 8 mutational steps of distance from the others, which was  
232 also detected in the concatenated analysis. The presence of several average vectors in the  
233 COI, but especially in the concatenated analysis, probably reflects the effect of constant  
234 bottlenecks in the population structure of the target species.

235 As concerns the spatial distribution of haplotypes, the population of Capão do Leão  
236 presented COI and concatenated haplotypes highly dispersed along the network, whereas  
237 Pontal da Barra and Shopping individuals were somewhat restricted in the concatenated  
238 network (Fig. 2). The grouping of these two populations was also suggested by the  
239 SAMOVA analysis, according to which the subdivision of the sampling area in four main

240 groups would be able to explain 25% of the encountered diversity. When such a structure  
241 was evaluated through pairwise K2P distance estimates, both, the maximum  
242 intrapopulation and the minimum interpopulation reached a value of 0.004, as  
243 encountered between two individuals sampled in Rio Piratini, Capão do Leão and Eliseu  
244 Maciel.

245 The chronophylogenetic analysis performed in Beast inferred the most recent  
246 common ancestor (MRCA) of *A. nigrofasciatus* to 0.313 mya, whereas the divergence of  
247 *A. nigrofasciatus* and *A. wolterstorffi* was dated to 3.398 mya, during the early to mid-  
248 Pliocene (Fig. 3). In this case, individuals of Eliseu Maciel and Capão do Leão appeared as  
249 the early offshoots, and presented their divergences dated to a mean of 0.308 mya and  
250 0.285 mya, respectively. As most individuals collected at Shopping appeared as derived  
251 branches within the phylogeny, this was dated as the most recent population, with  
252 divergence dated to a mean of 0.250 mya.

253 Differences in morphology were found between males and females, proving the  
254 sexual dimorphism of *A. nigrofasciatus* (see appendices). Based on this, males and females  
255 were separated for morphometric analysis, and significant differences in morphology  
256 patterns between the studied populations were detected only for males (Fig. 4).  
257 Interestingly, the only populations appearing somewhat overlapped in the CVA were  
258 Pontal da Barra and Capão do Leão, and this was also reflected in the dendrogram  
259 constructed through the use of clustered Mahalanobis distances (see appendices).

260

261

262

## DISCUSSION

263

264 It is commonly assumed that species living in fragmented habitats are subject to  
265 low genetic diversity due to inbreeding and genetic drift (Beheregaray *et al.*, 2016). These  
266 forces reduce the levels of intrapopulational diversity, increasing the risk of mutational  
267 meltdown and inbreeding depression (Frankham *et al.*, 2013). In this sense, considering the  
268 environmental, metabolic and demographic conditions usually faced by Rivulidae species,  
269 it is assumed that these fish are subject to high levels of evolutionary rates, which can lead  
270 to differentiation between populations and ultimately, to allopatric speciation (Whitlock,  
271 2000; Loureiro, 2004).

272 This study agrees with this scenario, revealing significant differentiation levels  
273 between populations of *A. nigrofasciatus* separated by a minimum of 3 km, in an isolation-  
274 by-distance divergence pattern. The considerable structure between populations in such an  
275 endemic species not only suggests that vicariance had an important role in the evolution of  
276 annual fish, as also shown by other authors (Jowers *et al.*, 2008; García *et al.*, 2012; García  
277 *et al.*, 2015; Ponce de León *et al.*, 2014), but evokes this as an important phenomenon even  
278 in small geographical scales.

279 In fact, the studied populations have revealed not only the presence of moderate to  
280 strong levels of genetic differentiation, with a reduced number of shared haplotypes, but  
281 have also shown significant morphological differences, at least when the males are  
282 concerned. The Mahalanobis squared distance found in the morphometry analysis can be  
283 considered high, with extremes as those found between Rio Piratini and Shopping for  
284 example, higher than the distances presented between different species of *Austrolebias*  
285 (García *et al.*, 2009). In a conservation perspective, these findings highlight the fact that  
286 each Rivulidae population may encompass a unique genetic stock, which should be  
287 urgently preserved, especially in regard to such a restricted species as *A. nigrofasciatus*.

288 Despite the moderated-to-high  $F_{st}$  values and the evidences of morphological

289 differentiation, the populations of *A. nigrofasciatus* should be treated only as management  
290 units, or demographically independent populations (Beheregaray *et al.*, 2016), since neither  
291 of them was reciprocally monophyletic. Moreover, the values of pairwise divergence  
292 estimated between populations were generally low (0.2% to 0.6%), and similar to those  
293 reported by Ponce de León *et al.* (2014) between two populations of *R. cylindraceus* (0.3%  
294 to 0.5%). Nevertheless, it is important to highlight the higher  $F_{st}$  values and the high  
295 morphometric differentiation presented by the population of Rio Piratini, which is probably  
296 related to the greater geographic distance of this in relation to the other populations.

297         In accordance to this scenario, the early offshoots in our chronophylogenetic tree  
298 were constituted by individuals sampled at Capão do Leão and Eliseu Maciel, whose  
299 divergences were dated to the Pleistocene, at approximately 0.31 and 0.28 mya,  
300 respectively, close to the MRCA of the entire species. So, the areas next to the São  
301 Gonçalo channel may encompass the ancestral distribution area of the species, which latter  
302 diversified and somewhat expanded its distribution to regions more distant of the channel.  
303 Even so, the most recent population, Shopping, was established at approximately 0.25  
304 mya. So, the diversification of *A. nigrofasciatus* was possibly associated to the marine  
305 regressive events which affected the Patos-Mirim drainage system during the Pleistocene  
306 (Sprechman, 1978; Montaña & Bossi, 1995), especially those occurring between 0.325 and  
307 0.125 mya (Lopes *et al.*, 2010).

308         Despite the recent origin, the overall diversity levels presented by *A. nigrofasciatus*  
309 taken as a whole can be considered high, especially in face of the small distribution area  
310 occupied by the species. In fact, considering only *cytb*, 19 haplotypes were detected for the  
311 target species, which contrasts with the 34 haplotypes of this gene found by Garcez (2016)  
312 for *A. wolterstorffi*, whose distribution area is much larger than that of *A. nigrofasciatus*.

313 Even so, the high number of exclusive haplotypes and the constant inference of median  
314 vectors attest the strength of genetic drift within each of these populations.

315         Nevertheless, this effect seems to be somewhat enhanced in some populations,  
316 possibly in virtue of antropogenic influence, as environmental contaminants and  
317 groundings. The negative impact of pollution on the levels of genetic diversity measured  
318 though the use of distinct molecular markers was previously evidenced for different  
319 species, but especially in aquatic ecosystems (Mussali-Galante *et al.*, 2014). In this sense,  
320 the two populations presenting the lower levels of haplotype and nucleotide diversity  
321 where those located at Pelotas city (Pontal da Barra and Shopping), which diverged in  
322 periods similar to the other populations, but live in wetlands presenting higher anthropic  
323 impact. Considering this, in face of the rapid degradation of wetlands that is currently in  
324 course on Brazil, it is clear the urgent need of interventions for ensure the preservation of  
325 Rivulidae (Volcan *et al.* 2015). The fact that each species may constitute a set of different  
326 managements units, whose identity needs to be individually preserved, further supports the  
327 hurry of the conservational interventions.

328

329

330

331

332

333

334

335



## REFERENCES

- 336
- 337
- 338 Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring  
339 intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 37-48.
- 340 Beheregaray, L., Attard, C., Brauer, C., Hammer, M. (2016). Innovations in conservation:  
341 How genetics can help save freshwater fishes. *Wildlife Australia* **53(3)**, 34-37. Available  
342 at: <http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=360341475387927;res=IELHSS>.  
343 ISSN: 0043-5481.
- 344 Brasil. Portaria nº445, de 17 de dezembro de 2014.
- 345 Brown, W. M., M. Jr. George, and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal  
346 mitochondrial DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State*  
347 *of America* 76: 1967–1971.
- 348 Costa, W. J. E. M. (1998). Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and  
349 evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes:  
350 Aplocheiloidei). *J. Comp. Biol.* **3**, 33-92.
- 351 Costa, W. J. E. M. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias*  
352 (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive,  
353 morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, **1213**, 1-162.
- 354 Costa, W., Amorim, P. A. (2011). New annual killifish species of the *Hypsolebias*  
355 *flavicaudatus* complex from the São Francisco River basin, Brazilian Caatinga  
356 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Vertebrate Zoology* **61(1)**, 99-104.
- 357 Drummond, A. J., Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by  
358 sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* (**7**). doi: 10.1186/1471-2148-7-214.

359 Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to  
360 define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**, 2571-2581.

361 Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (1993). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to  
362 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*  
363 *Resources*, **10**, 564-567.

364 Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for  
365 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan  
366 invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol* **3** (5), 294-299.

367 Frankham, R., Brook, B. W., Bradshaw, C. J. A., Traill, L. W., Spielman, D. (2013) 50/500  
368 rule and minimum viable populations: response to Jamieson and Allendorf. *Trends in*  
369 *Ecology & Evolution* **28**, 187–188.

370 Fu, Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,  
371 hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.

372 Fu, Y. X., Li, W. H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**, 693-  
373 709.

374 Futuyma, D. J. (2009). *Biologia evolutiva*. 3ed. Funpec, Ribeirão Preto, SP.

375 Garcez, D. K. (2016). Diversidade e estruturação genética no peixe anual *Austrolebias*  
376 *wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Master's dissertation. Universidade Federal  
377 do Rio Grande, Rio Grande, RS.

378 García, G. (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii*  
379 species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome  
380 data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **44** (1), 75-87.

381 García, G., Loureiro, M., Berois, N. Arezo, M. J., Casanova, G., Clivio, G., Olivera, A.  
382 (2009) Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias*

383 (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A  
384 multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society* **98**, 620-635.

385 García, G., Gutiérrez, V., Vergara, J., Calviño, P., Duarte, A., Loureiro, M. (2012) Patterns  
386 of population differentiation in annual killifishes from the Paraná-Uruguay-La Plata basin:  
387 The role of vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography* **39**, 1707-1719.

388 García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B.; Santiñaque, F., Lópezcarro, B., Folle, G.  
389 (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual  
390 killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica* **142**, 87-98.  
391 doi:10.1007/s10709-014-9756-7.

392 García, G., Ríos, N., Gutiérrez, V. (2015) Next-generation sequencing detects repetitive  
393 elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias*  
394 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica* **360**, 143-353.

395 Garcia-Vallve, S., Palau, J., Romeu, A. (1999) Horizontal gene transfer in glycosyl  
396 hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Biol*  
397 *Evol* **9**, 1125-1134.

398 ICMBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2014). Sumário  
399 executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes Rivulídeos ameaçados  
400 de extinção. Available at:  
401 [http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/faunabrasileira/plano-deacao/2833-](http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/faunabrasileira/plano-deacao/2833-planode-acao-nacional-para-a-conservacao-dosrivulideos.html)  
402 [planode-acao-nacional-para-a-conservacao-dosrivulideos.html](http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/faunabrasileira/plano-deacao/2833-planode-acao-nacional-para-a-conservacao-dosrivulideos.html). [28 December 2014].

403 Jowers, M.J., Cohen, B. L., Downie, J. R. (2008) The cyprinodont fish *Rivulus*  
404 (Aplocheiloidei: Rivulidae) in Trinidad and Tobago: molecular evidence for marine  
405 dispersal, genetic isolation and local differentiation. *Journal of Zoological Systematics and*  
406 *Evolutionary Research* **46**, 48-55.

407 Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base  
408 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol. Evol.* **16(2)**, 111-  
409 120.

410 Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric  
411 morphometrics. *Molecular Ecology Resources* **11**, 353-357.

412 Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA  
413 polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.

414 Lopes, R. P., Oliveira, L. C., Figueiredo, A. M. G., Kinoshita, A., Baffa, O., Buchmann, F.  
415 S. C. (2010). ESR dating of Pleistocene mammal teeth and its implications for the  
416 biostratigraphy and geological of the coastal plain, Rio Grande do Sul, southern Brazil.  
417 *Quaternary International*, **212**, 213-222.

418 Loureiro, M. (2004). Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu  
419 Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Doctoral thesis.  
420 Universidad de la República, Montevideo.

421 Matioli, S. R., Fernandes, F. M. C. (2012). Biologia molecular e evolução. Holos, São  
422 Paulo, SP.

423 Montaña, J. R., Bossi, J. (1995). Geomorfología de los humedales de la cuenca de la  
424 Laguna Merín en el departamento de Rocha. *Revista Facultad de Agronomía* (**2**), 1-32.

425 Murphy, W. J., Collier, G. E. (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes  
426 (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of  
427 annualism. *Mol. Biol.Evol.* **14**, 790-799.

428 Murphy, W. J., Thomerson, J. E., Collier, G. E. (1999). Phylogeny of the Neotropical  
429 Killifish Family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from  
430 Mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet.Evol.* **13(2)**, 289-301.

431 Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas, E. (2014). Genetic Structure  
432 and Diversity of Animal Populations Exposed to Metal Pollution. *Rev. Environ. Contam.*  
433 *Toxicol.* **227**, 79-106.

434 Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W. O., Stice, L., Grabowaki, G. (1991).  
435 The simple fool's guide to PCR version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine  
436 Laboratory, University of Hawaii, Honolulu.

437 Parenti, L. R. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform  
438 fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **168**, 335-557.

439 Podrabsky, J. E., Hand, S. (1999). The bioenergetics of embryonic diapause in annual  
440 killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* **202**, 2567-2580.

441 Ponce de León, J. L., León, G., Rodríguez, R., Metcalfe, C. J., Hernández, D., Casane, D.,  
442 García-Machado, E. (2014) Phylogeography of Cuban *Rivulus*: Evidence for allopatric  
443 speciation and secondary dispersal across a marine barrier. *Molecular Phylogenetics and*  
444 *Evolution* **79**, 404-414.

445 Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and*  
446 *Evolution* **25**, 1253-1256.

447 Rambaut, A., Drummond, A. J. (2013). Tracer v. 1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

448 Rambaut, A. (2016). FigTree, ver. 1.4.3. Available at:  
449 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [October 2016].

450 Rio Grande do Sul. Decreto nº51797, de 8 de setembro de 2014.

451 Rohlf, F. J. (2016). TpsDig Version 2.26. Department of Ecology and Evolution, Stony  
452 Brook University, New York, NY.

453 Rosa, R. S., Lima, F. C. T. (2008). Peixes. In: Livro vermelho da fauna brasileira  
454 ameaçada de extinção. (Machado, A. B. M.; Drummond, G. M. & Paglia, A. P., eds).  
455 Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF.

456 Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing  
457 phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

458 Sambrook, J., Fritschi, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.  
459 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

460 Sprechman, P. (1978). The paleoecology and paleogeography and stratigraphy of the  
461 Uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. *Zitteliana* (**4**), 3-72.

462 Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* **5**, 233-241.

463 Tajima, F. (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA  
464 polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.

465 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular  
466 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.

467 Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B., Señorans, J. S. (1966). Integracion de la fauna de  
468 vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Comp. Trab. Dpto.*  
469 *Zool. Vert.* **25**, 1-16.

470 Volcan, M. V. (2009). Crescimento e fecundidade do peixe anual *Austrolebias*  
471 *nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) sob condições de laboratório. Master's  
472 dissertation. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

473 Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, A. C. (2009). Threatened fishes of the world:  
474 *Austroebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe, 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae).  
475 *Environ. Biol. Fish.* **86(3)**, 443-444.

476 Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Cheffe, M. M. (2010). Distribuição e conservação de  
477 peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no município do Chuí, sul do Brasil.  
478 *Biotemas* **23(4)**, 51-58.

479 Volcan, M. V., Fonseca, A. P., Robaldo, R. B. (2011). Reproduction of the threatened  
480 annual killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a  
481 natural environment. *J.Threat. Taxa* **3(6)**, 1864-1867.

482 Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, Â. C. (2014). *Austrolebias bagual*, a new  
483 species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from southern Brazil. *Aqua* **20**, 4-  
484 15.

485 Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, A. C., Guadagnin, D. L. (2015) Annual fishes  
486 (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and  
487 conservation. In: Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution (Berois,  
488 N., García, G., de Sá, R. O., eds). pp. 185-203. Boca Raton, FL: CRC Press.

489 Whitlock, M. C. (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations:  
490 drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* **54**, 1855-1861.

491 Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P. (1999). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A  
492 Reliable Method for Species Identification. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 1350-1355.

493

494

495

496

497

498

499

## TABLES

500 **Table I** Genetic diversity estimates and neutrality tests performed for *A. nigrofasciatus* in regard to  
 501 each of the sampling localities.

502

503

504

505

506

507

508

509

510

Molecular marker	Population	N	H	EH	Hd/sd	$\pi$ /sd	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F	Fu's Fs
cytb	Rio Piratini	12	6	4	0,864 ± 0,00513	0,00448 ± 0,0000003	-0,12333	0,24296	0,16847	-0,123
	Capão do Leão	21	5	3	0,714 ± 0,00405	0,00312 ± 0,0000004	-0,35742	-0,72003	-0,71343	1,093
	Av. Eliseu Maciel	18	7	3	0,792 ± 0,00785	0,00443 ± 0,0000005	0,19967	0,53487	0,50905	-0,368
	Pontal da Barra	14	4	3	0,495 ± 0,02267	0,00116 ± 0,0000003	-1,62314	-1,68118	-1,89996	-0,812
	Shopping	13	4	2	0,526 ± 0,02333	0,00231 ± 0,0000019	-1,94465*	-2,25120*	-2,47481*	0,808*
COI	Rio Piratini	11	7	6	0,927 ± 0,00294	0,00382 ± 0,0000001	0,36771	0,67416	0,67460	-1,101
	Capão do Leão	19	14	10	0,953 ± 0,00128	0,00450 ± 0,0000002	-0,38596	-0,26035	-0,34410	-6,395
	Av. Eliseu Maciel	20	10	8	0,884 ± 0,00258	0,00364 ± 0,0000001	0,87789	0,93475	1,06399	-2,109
	Pontal da Barra	14	8	6	0,624 ± 0,00955	0,00278 ± 0,0000005	-1,14103	-1,05661	-1,23545	-2,287
	Shopping	15	2	-	0,248 ± 0,01708	0,00102 ± 0,0000003	-0,62465	1,15208	0,77946	2,615

511 N, number of individuals; H, number of haplotypes; EH, Exclusive Haplotypes; Hd, haplotype diversity; sd,  
 512 standard deviation;  $\pi$ , nucleotide diversity; Tajima's D, Fu and Li's D, Fu and Li's F, Fu's Fs, neutrality tests.  
 513 Significant values ( $p < 0.05$ ) are indicated by an “\*”.

514

515

516 **Table II** Pairwise FST values obtained in the comparisons between *A. nigrofasciatus* sampling  
 517 localities. Significant values ( $p < 0.05$ ) are indicated by an “\*”. Values above the diagonal refer to  
 518 *cytb*, whereas those below the diagonal were obtained with *COI*.

519

520

521

522

523

524

525

	Rio Piratini	Capão do Leão	Av. Eliseu Maciel	Pontal da Barra	Shopping
Rio Piratini		0,26254*	0,17828*	0,23351*	0,19605*
Capão do Leão	0,22527*		0,20451*	0,12559*	0,16300*
Av. Eliseu Maciel	0,19473*	0,16401*		0,20201*	0,14540*
Pontal da Barra	0,42356*	0,17344*	0,31257*		0,01292
Shopping	0,51697*	0,23876*	0,36135*	0,07359	



526

## FIGURE CAPTIONS

527

528 **Figure 1-** Landmarks used for digitalizing the *A. nigrofasciatus* image: (1) rostral tip of  
529 premaxilla, (2) anterior margin through midline of orbit, (3) posterior margin through  
530 midline of orbit, (4) anterior insertion of dorsal fin, (5) posterior insertion of dorsal fin, (6)  
531 dorsal insertion of caudal fin, (7) ventral insertion of caudal fin, (8) posterior insertion of  
532 anal fin, (9) anterior insertion of anal fin, (10) dorsal end of opercle.

533

534

535 **Figure 2-** Median-joining network of the 19 cytb (717 pb) (A), the 35 COI (970 pb) (B)  
536 and the 43 concatenated haplotypes (C) sampled for *A. nigrofasciatus*. The size of circles is  
537 proportional to the haplotype frequency. The colors refer to geographic origins, given in  
538 the legend to the left. Lines with numbers correspond to the position of each mutational  
539 step.

540

541

542 **Figure 3-** Chronophylogenetic tree generated by BEAST using an uncorrelated lognormal  
543 relaxed molecular under the HKY+I+G nucleotide substitution model, based on the 73  
544 concatenated sequences sampled for *A. nigrofasciatus*, using *A. wolterstorffi* as outgroup.

545

546

547 **Figure 4-** Plots generation through canonical variate analysis for the *A. nigrofasciatus*  
548 morphometry patterns: (A) males, (B) females. The colors refer to different populations:  
549 (purple) Rio Piratini, (yellow) Capão do Leão, (red) Eliseu Maciel, (green) Pontal da  
550 Barra, (blue) Shopping.

551

## FIGURES AND APPENDICES

552

553 **Figure 1**

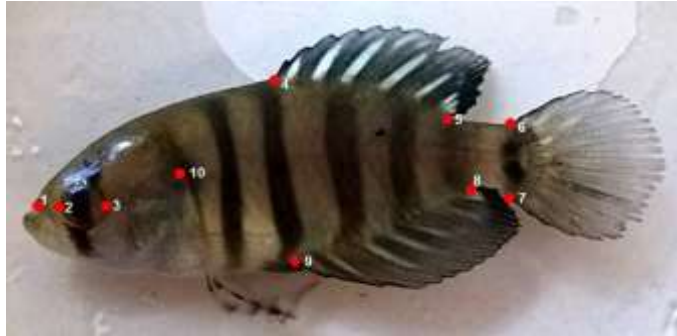
554

555

556

557

558



559

560 **Figure 2**

561

562

563

564

565

566

567

568

569

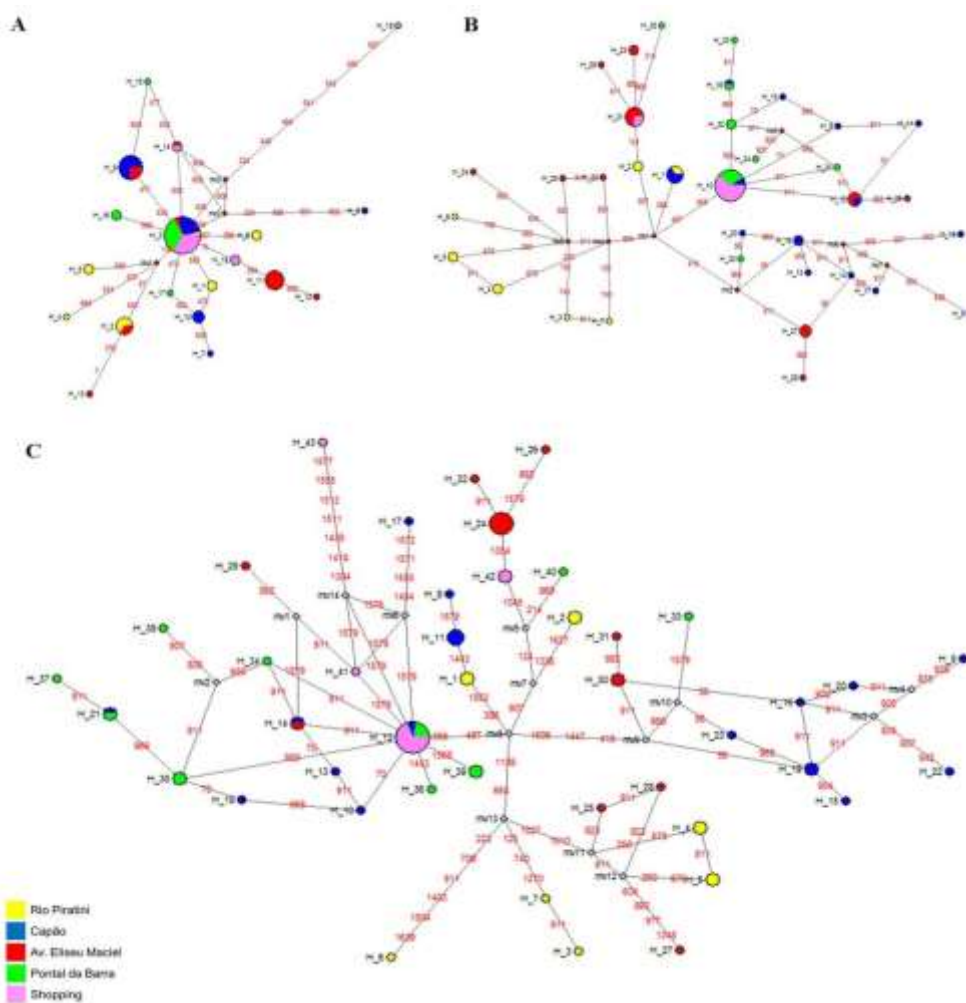
570

571

572

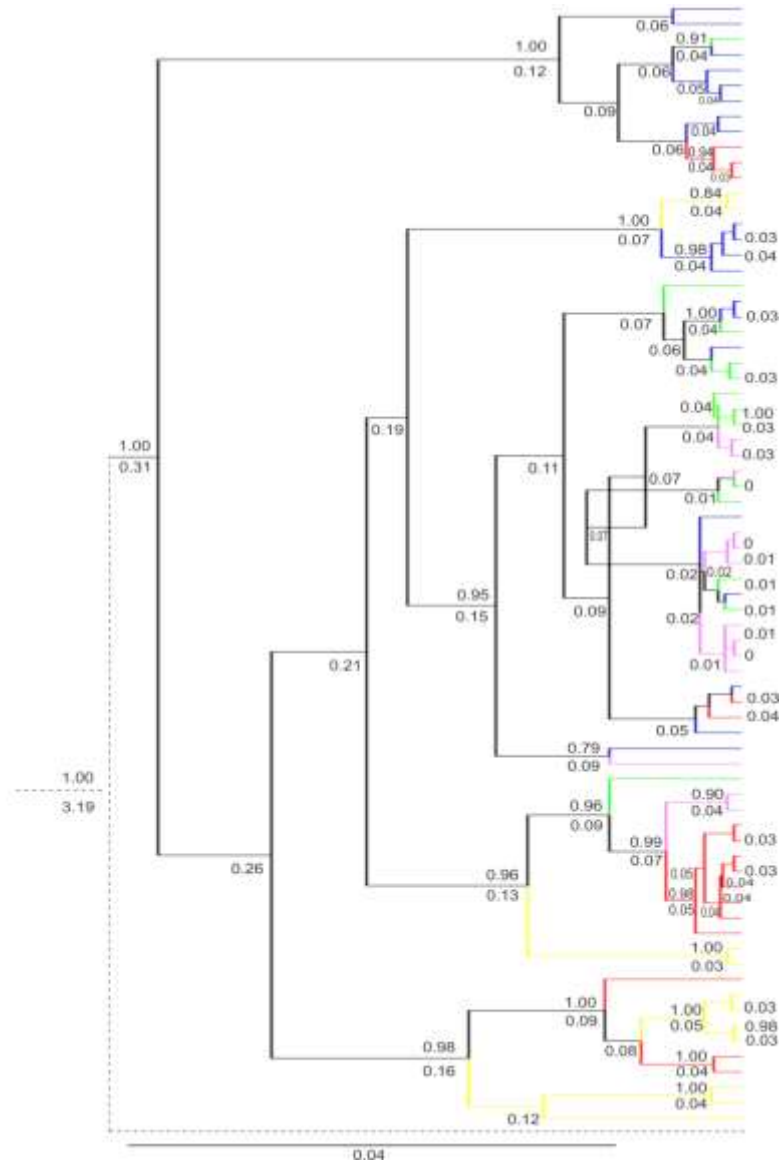
573

574



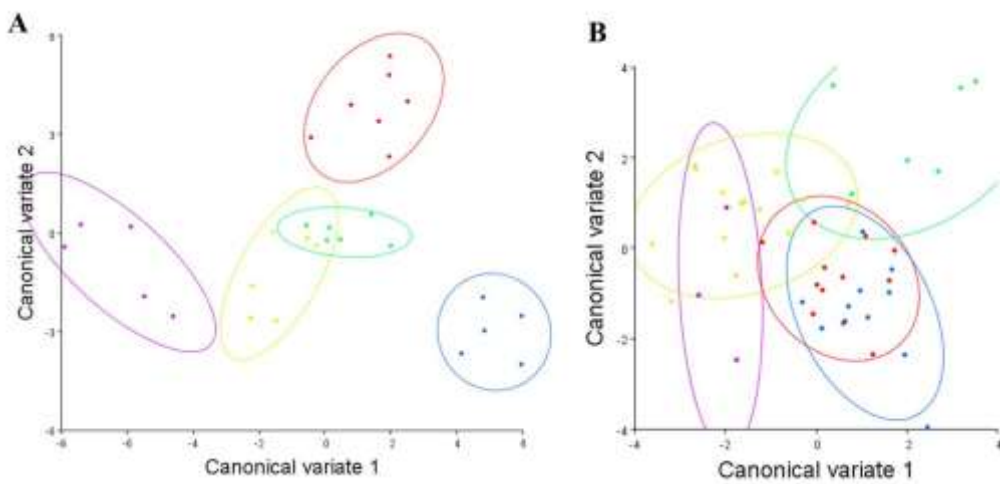
575 **Figure 3**

576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589



590 **Figure 4**

591  
592  
593  
594  
595  
596



597 **Appendice 1** Summary of analyzed material.

598	Sampling location	Name of sampling location	Coordinates	ID	Gender	Geometric morphometry	Molecular analysis	
							COI	cytb
599	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA1	M	✓	✓	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA2	M	✓	-	-
600	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA3	M	✓	✓	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA4	M	✓	✓	✓
601	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA5	M	✓	-	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA6	F	-	✓	✓
602	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA7	F	✓	✓	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA8	F	-	✓	✓
603	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA9	F	✓	✓	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA10	F	-	✓	✓
604	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA11	F	-	✓	✓
	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA12	F	-	✓	✓
605	1	Várzea do Rio Piratini	-52,6568; -31,892497	NA13	F	✓	✓	✓
605	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC1	M	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC2	M	✓	✓	✓
606	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC3	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC4	F	✓	-	✓
607	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC5	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC6	F	✓	✓	✓
608	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC7	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC8	F	✓	✓	✓
609	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC9	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC10	F	✓	✓	✓
610	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC11	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC12	F	✓	✓	✓
611	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC13	M	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC14	M	✓	✓	✓
612	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC15	M	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC16	M	✓	-	✓
613	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC17	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC18	F	✓	✓	✓
614	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC19	F	✓	✓	✓
	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC20	F	✓	✓	✓
615	2	Campus UFPel, Capão do Leão	-52,4191; -31,805392	NC21	F	✓	✓	✓
615	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE1	M	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE2	M	✓	✓	✓
616	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE3	M	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE4	M	✓	✓	-
617	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE5	M	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE6	M	✓	✓	✓
618	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE7	M	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464; -31,796492	NE8	F	-	✓	-

619	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE9	F	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE10	F	✓	✓	✓
620	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE11	F	✓	✓	-
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE12	F	✓	✓	✓
621	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE13	F	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE14	F	✓	✓	✓
622	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE15	F	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE16	F	✓	✓	✓
623	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE17	F	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE18	F	✓	✓	✓
624	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE19	F	✓	✓	✓
	3	Av. Eliseu Maciel	-52,39464;-31,796492	NE20	F	✓	✓	-
625	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP1	M	✓	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP2	M	✓	✓	✓
626	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP3	M	✓	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP4	M	✓	✓	✓
627	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP5	M	-	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP6	M	✓	✓	✓
628	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP7	M	✓	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP8	F	✓	✓	✓
629	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP9	F	-	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP10	F	✓	✓	✓
630	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP11	F	✓	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP12	F	✓	✓	✓
631	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP13	F	✓	✓	✓
	4	Pontal da Barra	-52,231411;-31,778426	NP14	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS1	M	-	✓	✓
632	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS2	M	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS3	M	✓	✓	✓
633	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS4	M	✓	✓	-
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS5	M	✓	✓	✓
634	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS6	M	✓	✓	-
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS7	F	✓	✓	✓
635	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS8	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS9	F	✓	✓	✓
636	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS10	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS11	F	✓	✓	✓
637	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS12	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS13	F	✓	-	-
638	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS14	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS15	F	✓	-	-
639	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS16	F	✓	✓	✓
	5	Próximo ao Shopping Pelotas	-52,314459;-31,762445	NS17	F	✓	✓	✓
640								

641 **Appendice 2** Plots generated through canonical variate analysis proving the dimorfism between  
642 males and females of *A. nigrofasciatus*. The agroupment at left include males, at right females.

643

644

645

646

647

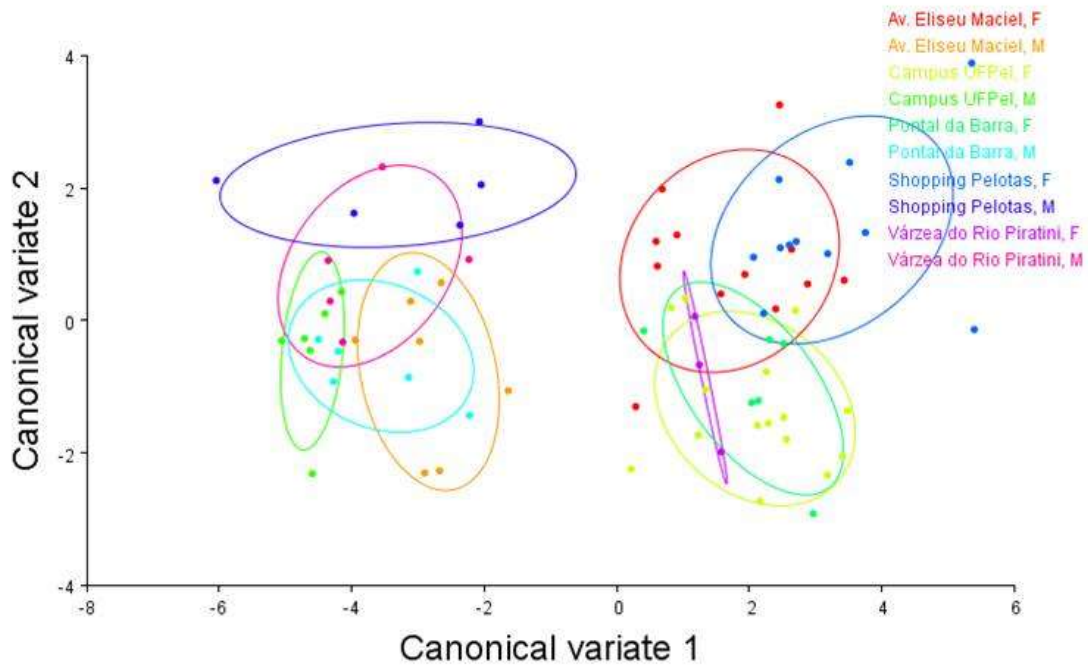
648

649

650

651

652



653 **Appendice 3-** Dendrogram constructed using the Mahalanobis distance clustered by  
654 UPGMA.

655

656

657

658

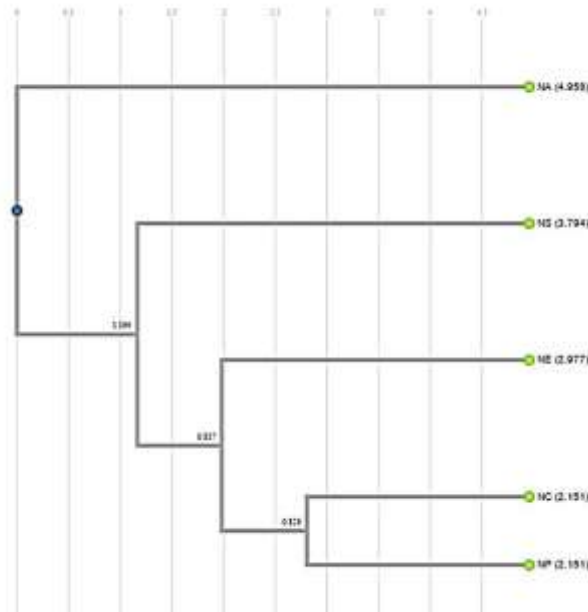
659

660

661

662

663



## Considerações Finais

Este trabalho permitiu a obtenção de informações importantes sobre a diversidade genética da espécie *A. nigrofasciatus*. A hipótese inicial relacionada à presença de altos níveis de diferenciação interpopulacional foi confirmada. Tal hipótese se embasou no princípio de que populações pequenas e isoladas estão fortemente sujeitas à ação de mecanismos evolutivos, dentre os quais se destaca a deriva genética. De fato, padrões similares foram reportados para outras espécies de peixes anuais (García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2012; García *et al.*, 2015; Ponce de León *et al.*, 2014; Garcez, 2016). Ainda assim, a espécie *A. nigrofasciatus* considerada como um todo apresenta valores moderadamente altos de diversidade genética, visto o grande número de haplótipos (a maior parte dos quais exclusivos de uma única população) recuperados em relação à restrita área de distribuição da espécie. Para fins comparativos, vale dizer que níveis similares de diversidade foram recentemente observados por Garcez (2016), analisando *A. wolterstorffi*, uma espécie cuja distribuição é muito maior que a de *A. nigrofasciatus*.

Analisando-se as populações independentemente, as populações Pontal da Barra e Shopping apresentaram baixos níveis de diversidade genética, sendo que na população Shopping, a situação parece ser mais crítica. Esta situação parece ter relação com os impactos antrópicos, como poluição e aterramentos, visto que estas populações habitam ambientes mais impactados que as demais, ainda que seu tempo de diversificação não tenha se revelado tão distinto, especialmente com relação ao Pontal da Barra. Em contrapartida, a população Capão do Leão apresenta uma alta diversidade, a qual foi comprovada por todas as análises realizadas, condizente com o status de divergência mais basal sugerido pela análise cronofilética e pela maior conservação apresentada pelo biótopo. É, pois, interessante pensar que ainda que todos os adultos da espécie aqui

considerada morram naturalmente ao final da estação chuvosa, os efeitos crônicos do impacto antrópico não parecem estar sendo “zerados” a cada geração, possivelmente devido aos seus impactos no tamanho efetivo de cada população.

Outro aspecto notável quanto aos padrões de distribuição da diversidade genética em *A. nigrofasciatus* refere-se a população do Rio Piratini, que se mostrou mais diferenciada genética e morfológicamente, provavelmente devido a sua maior distância geográfica com relação as demais. Ainda assim, a ausência de monofilia recíproca e de um intervalo entre as distâncias intra e interpopulacionais parecem não ser compatíveis com a hipótese de que esta constitua uma espécie diferente de *Austrolebias* pertencente ao grupo de *A. adloffii*. De qualquer forma, os fortes indícios de diferenciação entre a maior parte das populações indicam que cada área úmida abriga padrões únicos de diversidade, que devem ser individualmente preservados. No entanto, a necessidade de intervenções parece ser ainda mais urgente para as populações do Pontal da Barra e do Shopping.

Conclui-se, assim, que este trabalho atingiu seus objetivos, auxiliando na obtenção de informações acerca da evolução e diversidade de *A. nigrofasciatus*. Tais informações possibilitarão a elaboração de estratégias específicas de conservação da espécie, visando a manutenção da variabilidade genética da mesma. No entanto, mais estudos se fazem necessários para garantir a preservação dos peixes anuais. Neste sentido, foram elaboradas as seguintes perspectivas futuras:

- análise da diversidade e estruturação de *A. nigrofasciatus* por meio de marcadores nucleares;
- aumento do número de indivíduos e populações amostradas;
- realização de análises similares em outras espécies de peixes anuais, iniciando-se pelas demais espécies do complexo *A. adloffii*;



- investigar os limites de distribuição da espécie, através de ferramentas relacionados ao DNA-Barcode.

Além disso, para fins de conservação da espécie, é fundamental que o conhecimento gerado por este estudo seja divulgado junto à comunidade e às autoridades gestoras dos municípios de Pelotas e Capão do Leão, onde deve ser encorajada a adoção de programas de educação ambiental e a criação de áreas de proteção.

## Bibliografia

BEROIS, N.; GARCÍA, G.; DE SÁ, R. O. 2015. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. 1ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. 342p.

COSTA, W. J. E. M. 1990. Análise filogenética da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei). Revista Brasileira de Biologia, vol. 50, p. 65-82.

COSTA, W. J. E. M. 2008. Catalog of Aplocheiloid killifishes of the world. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

COSTA, W. J. E. M. 2010. Historical biogeography of Cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. Journal of Biogeography, vol. 37, p. 1995-2004.

COSTA, W. J. E. M. 2013. Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). Vertebrate Zoology, vol. 63, p. 139-154.

DE SÁ, R. O., BEROIS, N., GARCÍA, G. 2015. Overview, Future Challenges, and Evolution of Annualism. In: BEROIS, N., GARCÍA, G., DE SÁ, R.O. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 309-318.

ESCHMEYER, W., FONG, J. D. 2016. Catalog of fishes electronic version. California Academy of Sciences. Disponível em <<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>> Acesso em: 19 de setembro de 2016.

FURNESS, A. I. 2015. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. vol. 91, no. 3, p. 796-812.

GARCÍA, G., WLASIUK, G., LESSA, E. 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Zool. J. Linn. Soc., vol. 129, p. 93-110.

GARCÍA, G.; ALVAREZ-VALIN, F.; GOMEZ, N. 2002. Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 76, p. 49-59.

GONÇALVES, C. S., SOUZA, U. P., VOLCAN, M. V. 2011. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. Neotrop. Ichthyol. Vol. 9, no. 1, p. 191-200.

GUTIÉRREZ, V.; AREZO, M. J.; GARCÍA, G. 2007. Characterization of partial Hox genes sequences in annual fishes of the Cynolebiatinae subfamily (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Genetics and Molecular Biology, vol. 30, p. 494-503.

HHBEK, T.; LARSON, A. 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A Molecular Phylogenetic and Biogeographic Perspective. Evolution, vol. 52, no. 4, p. 1200-1216.

LANÉS, L. E. K. 2011. Dinâmica e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe. São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 60 p. Dissertação de Mestrado em Biologia.

LOUREIRO, M.; DE SÁ, R. O. 2015. Diversity of Aplocheiloidei. In: Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. In: BEROIS, N., GARCÍA, G., DE SÁ, R.O. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 3-31.

LOUREIRO, M.; BORTHAGARAY, A., HERNÁNDEZ, D.; DUARTE, A.; PINELLI, V.; ARIM, M. 2015. *Austrolebias* in Space: Scaling from Ponds to Biogeographical Regions. In: BEROIS, N., GARCÍA, G., DE SÁ, R.O. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 111-132.

NIELSEN, D. T. B.; PILLET, D. 2015. *Austrolebias accorsii*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae) from the upper río Grande basin, Amazon basin, Bolivia. *aqua, International Journal of Ichthyology*, vol. 21, p. 172-179.

REIS, R. E.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, L. R. 2003. Peixes. In: FONTANA, C. S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. 1ed. Porto Alegre: EDIPUCRS. vol. 1, p. 1-632.

SANMARTIN, I.; RONQUIST, F. 2004. Southern Hemisphere biogeography inferred by event-based models: Plant versus animal patterns. *Systematic Biology*. vol. 53, p.216–243.

SEMA. 2014. Secretaria Estadual de Meio Ambiente. Reavaliação da Lista das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul. [http://www.liv.fzb.rs.gov.br/livcpl/?idmodulo=1andid\\_uf=23](http://www.liv.fzb.rs.gov.br/livcpl/?idmodulo=1andid_uf=23). Acessado em Agosto de 2014.

VAN DER LAAN, R.; ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R. 2014. Family-group names of recent fishes. *Zootaxa*. vol. 3882, p. 1-230.