



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Diversidade e estruturação genética no peixe anual
Austrolebias wolterstorffi (Cyprinodontiformes:
Rivulidae)

Daiana Kaster Garcez

Orientador: Dra. Lizandra Jaqueline Robe
Coorientador: Dr. Daniel Loebmann

Rio Grande
2016



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Diversidade e estruturação genética no peixe anual *Austrolebias
wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

Aluno: Daiana Kaster Garcez

Orientador: Dra. Lizandra Jaqueline Robe

Co-orientador: Dr. Daniel Loebmann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2016

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao Geison,
pelo amor e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lizandra Robe, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela amizade, ensinamentos, paciência e compreensão durante os últimos dois anos.

Ao Daniel, pela orientação e auxílios nas coletas do material biológico.

Ao Matheus, pelo apoio, pelas oportunidades e pela ajuda nas inúmeras saídas de campo a procura dos fascinantes peixes anuais.

À Thaísa, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência, pela amizade, pelos conselhos, conversas amigas e por ter me aturado nesses dois anos.

À Crislaine, pela grande ajuda na execução deste trabalho, e também, por se apaixonar pelos peixes anuais.

Ao Diego e a Bruna, pela ajuda de sempre.

À todos os amigos do Laboratório de Genética e do PPGBAC, pelas conversas e companheirismo, principalmente, à Carol e ao Henrique.

À Universidade Federal do Rio Grande e ao PPG em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, por oportunizar a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro na realização deste trabalho e pela bolsa de mestrado.

Às amigas de sempre, da Biologia (UFPel): Cris, Dani, Ju, Nati, e do IFSul: Tanize e Maitê, pela amizade verdadeira e por sempre estarem na torcida.

Aos meus pais, pelo amor, pelo exemplo, apoio e confiança. E por nunca desistirem de batalhar por uma vida melhor.

À toda a minha família, por toda a amizade e amor.

Ao Toby, por sempre proporcionar momentos de alegria e ser um grande amigo.

Ao Geison, por todo amor, apoio, companheirismo e compreensão dedicados. E por compartilhar comigo a sua vida e realização de sonhos.

RESUMO

Peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) constituem um grupo fascinante de peixes de água doce, que vivem em poças d'água temporárias que se formam durante os períodos chuvosos, possuindo um ciclo de vida curto. Estas espécies estão sujeitas a ação de um conjunto de condições evolutivas, demográficas e metabólicas que podem resultar na rápida divergência entre populações. Alguns destes mecanismos, acrescidos da degradação e fragmentação das áreas úmidas, fazem dos peixes-anuais um dos grupos de vertebrados mais ameaçados. *Austrolebias wolterstorffi* difere de outras espécies de *Austrolebias* por seu maior tamanho corporal e faixa de distribuição, ocorrendo em poças temporárias desde o norte da Lagoa dos Patos até o sul da Lagoa Mirim. Como esta espécie é considerada Criticamente Ameaçada de extinção, e como o estabelecimento de qualquer estratégia de conservação deve ser precedida por estudos desenhados no sentido de compreender os níveis e a distribuição geográfica da variação genética dentro da espécie-alvo, este estudo visa caracterizar os níveis de diversidade e diferenciação genética ao longo da área de distribuição de *A. wolterstorffi*. Para isso, 94 espécimes desta espécie tiveram 798 pb do gene mitocondrial citocromo b sequenciados, sendo então analisados através de enfoques filogenéticos e filogeográficos. Nossas análises revelaram a presença de níveis significativos de diferenciação entre muitas populações, em um padrão de isolamento-por-distância. Adicionalmente, de acordo com a rede de haplótipos, com a árvore filogenética e com a SAMOVA, *A. wolterstorffi* encontra-se subdividida em pelo menos cinco diferentes grupos de populações, sendo este esquema de agrupamentos capaz de explicar mais de 76% da variação encontrada na espécie. Isto sugere que fragmentação alopátrica ou vicariância tem desempenhado um papel importante na diversificação de *A. wolterstorffi*, que pode representar um complexo de espécies com um contínuo de diferentes estágios de especiação. Inspeções morfológicas futuras podem confirmar a presença destas novas espécies insipientes, embora especiação críptica também seja uma possibilidade. Nossos achados sugerem ainda que o haplogrupo uruguaio é derivado com relação aos haplogrupos brasileiros. Assim, este estudo auxiliou na compreensão do cenário evolutivo associado a origem e diversificação de *A. wolterstorffi*, ao mesmo tempo que evidenciou a necessidade de adotar estratégias de conservação independentes em cada uma das cinco áreas maiores cobertas por este estudo, quatro das quais estão localizadas no Brasil.

Palavras-chave: fragmentação alopátrica; sistema lagunar Patos-Mirim; vicariância.

ABSTRACT

Annual fishes (Cyprinodontiformes: Rivulidae) are a fascinating group of freshwater fishes, which live in temporary wetlands formed during rainy periods and possess an short life cycle. These species are subject to the action of a set of evolutionary, demographic and metabolic conditions, which can result in rapid divergence between populations. Some of these mechanisms, added to the degradation and fragmentation of wetlands, make annual fishes one of the most threatened groups of vertebrates. *Austrolebias wolterstorffi* differs from the other species of *Austrolebias* by its larger size and distribution range, occurring in isolated temporary ponds from the northern Laguna dos Patos to the south of the Mirim Lagoon. As this species is considered Critically Endangered, and as the establishment of any conservation strategy needs to be preceded by studies designed to understand the level and the geographic distribution of genetic variation within the target species, this study aims to characterize the levels of genetic diversity and differentiation within the entire distribution range of *A. wolterstorffi*. For this, 94 specimens of this species had 798 bp of the mitochondrial gene cytochrome b sequenced, and were analyzed through phylogenetic and phylogeographic approaches. Our analysis revealed the presence of significant levels of differentiation between several populations, in a pattern of isolation by distance. Additionally, according to the haplotype network, the phylogenetic tree and the SAMOVA, *A. wolterstorffi* is subdivided into at least five different population groups along its distribution range, with this grouping scheme being able to explain more than 76% of the encountered variation. This suggests that allopatric fragmentation or vicariance has played an important role in the diversification of *A. wolterstorffi*, which may in fact represent a species complex with a continuum of different speciation stages. Further careful morphological inspection may confirm the presence of these new incipient species, although cryptic speciation may also be a possibility. Our findings also suggest the Uruguayan haplogroup as derived in respect to the Brazilian ones. So, this study has helped to shed some light in the evolutionary scenario related to the origin and diversification of *A. wolterstorffi*, while evidencing the need of independent conservation strategies in each of the five major areas covered by this study, four of which are located in Brazil.

Key-words: allopatric fragmentation; Patos-Mirim lagoon system; vicariance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
A família Rivulidae.....	12
O gênero <i>Austrolebias</i>	13
O grupo de espécies <i>A. elongatus</i>	17
<i>Austrolebias wolterstorffi</i>	18
O sistema de drenagens Patos-Mirim.....	19
OBJETIVOS	21
HIPÓTESES	22
Referências	23
CAPÍTULO ÚNICO	31
High levels of genetic differentiation and incipient speciation within the Critically Endangered Neotropical annual fish, <i>Austrolebias wolterstorffi</i> (Cyprinodontiformes: Rivulidae).....	32
Abstract	33
Introduction	34
Materials and methods	36
Sampling.....	36
DNA Manipulation.....	37
Data Analysis.....	38
Results	40
Discussion	47
References	51
Additional files	55
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	58

LISTA DE FIGURAS

- 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 de *A. wolterstorffi* destacado. Retirado de Costa (2006).....15
- Figura II** Topologia da árvore bayesiana reconstruída com base em sequências do gene mitocondrial citocromo-b de diferentes espécies de *Austrolebias*, com o posicionamento de *A. wolterstorffi* destacado. Retirado de García et al. (2014).....16
- Figura III** Dimorfismo sexual em *A. wolterstorffi* (macho acima; fêmea abaixo). Foto: Daiana Garcez.....18
- Figure 1** Sampling locations (numbered 1–20) of individuals of *Austrolebias wolterstorffi* along Brazil (samples 1-11) and Uruguay (samples 12-20). Different symbols were used to denote the sampling sites of each of the five haplogroups recovered in the Network.....37
- Figure 2** Median-joining network of the 34 cytb haplotypes (798 bp) sampled for *A. wolterstorffi* along its distribution range. The size of the circles is proportional to the haplotype frequency, and the colors refer to geographic origins, given in the Legend to the left, and in congruence with Fig. 1. Lines with numbers correspond to the position of each mutational step along the alignment.....44
- Figure 3** Bayesian tree topology generated using the HKY+I+G nucleotide substitution model based on the 94 sequences of cytb sampled for *A. wolterstorffi* and using *A. nigrofasciatus*, *A. minuano* and *A. adlofi* as outgroups. Numbers above the branches are the Bayesian posterior probability values of clades, whereas numbers below the branches are the bootstrap values obtained from the NJ and ML analyses, respectively. Clades encompassing the haplogroups recovered in the Network were collapsed in order to facilitate comprehension, and each haplogroup is represented by a different color.....46

LISTA DE TABELAS

Table 1 Summary of analyzed material.....	55
Table 2 Genetic diversity estimates and neutrality tests performed for <i>A. wolterstorffi</i> as a whole, for each of the sampling localities, for Brazil and Uruguay groupings, and for each of the five haplogroups recovered in the Network.....	41
Table 3 Pairwise F_{ST} values obtained in the comparisons between <i>A. wolterstorffi</i> sampling localities. Significant values ($p < 0.05$) are indicated by an “*”.....	43
Table 4 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) following the subdivision of <i>A. wolterstorffi</i> in five groups, as suggested by the Network and by SAMOVA.....	45
Table 5 Net sequence divergence between the five groups of populations detected for <i>A. wolterstorffi</i> , measured with the use of the TrN+G nucleotide substitution model, with confidence estimated by bootstrap. Average values are presented below the diagonal, whereas the standard deviation is presented above the diagonal.....	47

INTRODUÇÃO GERAL

A subordem Aplocheiloidei de killifishes constitui um clado diversificado de pequenos peixes, que ocorrem em ambientes de água doce superficiais ou raramente em ambientes de água salobra (Costa, 2013). Esta subordem é composta por três famílias, com distribuição geográfica variável: Aplocheilidae, distribuída em Madagascar, Seychelles, Índia, Paquistão e Vietnã, composta atualmente por 14 espécies válidas; Nothobranchiidae, distribuída na África subsaariana, com 271 espécies; e Rivulidae, endêmica da América do Sul, Central e sul dos Estados Unidos, com cerca de 350 espécies (Costa, 2008; Loureiro & de Sá, 2015). As famílias Nothobranchiidae e Rivulidae, de killifishes anuais, compõem a superfamília Nothobranchioidea, e sua separação é congruente com a abertura do norte do Oceano Atlântico Sul (110 milhões de anos atrás; Sanmartín & Ronquist 2004; Costa 2013).

Os peixes anuais ou killifishes anuais constituem um grupo fascinante de peixes de água doce devido ao seu desenvolvimento particular, e às suas adaptações ecológicas e fisiológicas. Dentre os vertebrados, eles possuem um ciclo de vida curto, de menos de um ano, relacionado com as poças temporárias que habitam (Loureiro & de Sá, 2015). Assim, a característica mais marcante dos peixes anuais é precisamente a evolução do anualismo. Este traço ocorre devido a duas características incomuns destes peixes: (1) a morte anual de toda a população durante a estação seca (mortalidade extrínseca) e (2) a especialização dos ovos/embriões (embriões diapáusicos), que tornam suportável o ambiente severo onde vivem e são fundamentais para a sobrevivência destes peixes (Berois et al. 2014). Além disso, o apetite voraz, a maturação sexual precoce e a alta fecundidade são características típicas de peixes anuais (Furness, 2015) e evidenciam sua complexa adaptação aos ambientes efêmeros onde vivem.

Segundo Costa (1998) e Nelson (2006), o anualismo seria uma característica convergente entre Nothobranchiidae e Rivulidae. Já para Rivulidae, segundo o primeiro autor, o anualismo seria simplesiomórfico, sendo o não anualismo verificado em alguns gêneros uma reversão derivada. Para ele, a evolução do ciclo de vida anual estaria relacionada à colonização dos biótopos em duas etapas, a primeira ocorrendo em riachos rasos e corpos d'água permanentes, e depois em ambientes adjacentes e periféricos, como as poças temporárias. Entretanto, Hrbek e Larson (1999) defendem que o sistema de desenvolvimento de rivulídeos pode facilitar a evolução paralela de anualismo em habitats temporários, através da seleção natural imposta por forças ecológicas. De fato, análises mais recentes suportam a evolução convergente da diapausa

nos embriões de Notobranchioidea através de quatro eventos evolutivos independentes no Novo Mundo e pelo menos dois entre os peixes anuais do Velho Mundo (Furness et al., 2015). Ainda dentro do anualismo, a mortalidade extrínseca modelou a evolução da senescência, que evoluiu paralelamente ou posteriormente ao aparecimento da diapausa III, que constitui um estado de profunda depressão metabólica em embriões de peixes anuais, e é uma característica definidora do anualismo (de Sá et al., 2015). De fato, embora alguns indivíduos e espécies possam entrar em diapausa I e II, a passagem pela diapausa quando o embrião já está totalmente desenvolvido (diapausa III) parece ser obrigatória em todas espécies de peixes-anuais (citação).

Peixes anuais são bons modelos para estudos ecológicos e evolutivos relativos à evolução da história de vida e envelhecimento, à plasticidade fenotípica, à tolerância fisiológica e à adaptação a ambientes extremos (Furness, 2015). Suas adaptações reprodutivas e de desenvolvimento únicas, juntamente com a não sobreposição de gerações no tempo e no espaço, tornam os peixes anuais excelentes modelos para estudos de evolução. Além disso, a distribuição irregular de espécies de peixes anuais fornece condições naturais ideais para estudar os mecanismos evolutivos subjacentes (por exemplo, deriva genética, fluxo gênico, seleção, etc.) que podem resultar na rápida divergência entre populações, com ou sem diferenciação morfológica (de Sá et al., 2015). Do ponto de vista ecológico, os peixes anuais são considerados importantes componentes para o equilíbrio das áreas úmidas, pois geralmente são abundantes e possuem hábito alimentar oportunista, se alimentando principalmente de invertebrados (Volcan et al., 2011).

No entanto, peixes anuais neotropicais são particularmente afetados pela perda e fragmentação de áreas úmidas, uma vez que habitam exclusivamente ambientes efêmeros (Volcan et al., 2015). Sua reduzida plasticidade ecológica, associada à área de distribuição restrita e a baixa vagilidade da maioria das espécies, juntamente ao crescente ritmo de perda de áreas úmidas, faz dos peixes anuais um dos grupos de vertebrados mais ameaçados (Rosa; Lima, 2008; ICMBio, 2013; Volcan et al., 2015). Para grande parte das espécies, dados sobre a distribuição e informações ecológicas vitais para o planejamento e a adoção de estratégias de conservação e gestão são ausentes (Lanés, 2011). Diante desta situação, foi criado, no Brasil, o “Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção - PAN Rivulídeos” (ICMBio, 2013). Neste documento, a importância da realização de estudos técnicos e científicos, *in situ* e *ex situ*, aplicados à conservação das espécies focais de rivulídeos e seus habitats foi enfatizada (ICMBio, 2013). Por tudo isso, vários autores tem ressaltado a importância da

realização de estudos voltados à compreensão de diferentes aspectos da biologia destes peixes (Reis et al., 2003; Rosa; Lima, 2008; Volcan et al., 2009).

Independentemente do foco, no entanto, estudos com peixes anuais devem levar em conta as peculiaridades ecológico-evolutivas a que estes organismos estão sujeitos. Neste sentido, a fragmentação do habitat e as populações pequenas características destes peixes são propícias a forte atuação de mecanismos evolutivos do tipo deriva genética (Gillespie, 2001). O escasso poder de dispersão desses organismos também favorece o isolamento entre as populações. Por fim, gargalos de garrafa (Carvalho; Hauser, 1999) e endogamia têm importante influência sobre a evolução e a probabilidade de extinção destas populações (Whitlock, 2000). Esses mecanismos, junto com as altas taxas metabólicas (Cardozo, 1999), o curto tempo de geração e as características estressantes do ambiente que ocupam podem estar associados a altas taxas de evolução, que propiciam uma alta variabilidade morfológica e molecular. Além disso, a ação conjunta de todos estes fatores tem potencial de ocasionar não apenas a diferenciação entre as populações, como também a ocorrência de eventos de especiação, em especial, de especiação alopátrica. Jowers et al. (2008) encontraram evidências de isolamento populacional de *Rivulus* a longo prazo em áreas ou picos de montanhas de Trinidad, enfatizando a importância de refúgios geográficos como um fator de especiação.

A família Rivulidae

Rivulidae é uma das famílias mais diversificadas de peixes de água doce neotropicais, com cerca de 38 gêneros e 350 espécies descritas (Costa, 2008). Ocorre na América do Sul, Central e sul dos Estados Unidos (Costa, 2008). Na América Central, ocorrem entre a região central do México e Panamá e ao longo das drenagens do Pacífico, na Costa Rica e no Panamá; além disso, algumas espécies são endêmicas das Ilhas do Caribe. Na América do Sul, a família é amplamente distribuída na maioria das bacias hidrográficas cis-andinas, do norte da Venezuela ao sul da Argentina, no Brasil, Paraguai e Uruguai, bem como nas drenagens atlânticas da Colômbia e Venezuela, e noroeste da Colômbia. Na América do Norte há a ocorrência de um grupo de espécies tolerantes à água salgada (Costa, 1998; 2010). Ainda assim, o Brasil é berço da maior diversidade de rivulídeos, apresentando cerca de um terço das espécies (Costa, 2008). Pelo menos 37 espécies de Rivulidae são conhecidas para o estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e destas, 31 pertencem ao gênero *Austrolebias* (Volcan et al., 2015). Cerca de 70% das espécies de peixes de água doce ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul são rivulídeos (SEMA, 2014).

A monofilia de Rivulidae foi inicialmente proposta por Parenti (1981), e posteriormente corroborada por diferentes estudos filogenéticos, tanto usando caracteres morfológicos (Costa, 1990; 1998), quanto marcadores moleculares (Murphy; Collier, 1997). Costa (1990, 1998) e Murphy e Collier (1997) separaram todos os rivulídeos em duas grandes linhagens monofiléticas: Cynolebiatinae e Rivulinae. Cynolebiatinae é composto por cerca de nove gêneros, entre os quais se encontram os grupos irmãos *Leptolebias*, *Cynopoecilus* e *Campellolebias*, além do gênero *Spectrolebias*. Dentro desta subfamília, destaca-se também o gênero *Austrolebias*, que é considerado um grupo irmão de *Nematolebias* e *Simpsonichthys* (Costa, 1998).

O gênero *Austrolebias*

Austrolebias Costa, 1998 pertence à família Rivulidae e compreende cerca de 43 espécies de peixes anuais (Nielsen & Pillet, 2015). Estas espécies estão distribuídas nas bacias La Plata e Patos-Mirim (Loureiro & de Sá, 2015), onde habitam áreas úmidas temporárias formadas durante períodos chuvosos. Além disso, Nielsen & Pillet (2015) reportaram recentemente a presença de espécies de *Austrolebias* na Bacia do Amazonas. Nestes locais, como típico da família, os adultos morrem quando os habitats secam (Costa, 2006), mas os embriões dentro de ovos são capazes de sobreviver devido à diapausa. Quando há regiões sem estação de chuvas definida, a presença de água em poças temporárias é mediada pelo equilíbrio entre a precipitação, temperatura e evaporação. Assim, o ciclo de vida destas espécies está estreitamente limitado e relacionado à dinâmica temporal das áreas úmidas temporárias (Lanés, 2011).

A monofilia de *Austrolebias* vem sendo suportada tanto por análises morfológicas (Costa, 2006), quanto por estudos moleculares (García et al., 2000; García, 2006). De acordo com Costa (2006), as sinapomorfias que sustentam esta condição compreendem a ausência de escamas entre o canto da boca e a porção anterior da região pré-opercular e porção ventral da região opercular, osso urial profundo, 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. As espécies deste gênero tem chamado a atenção de biólogos evolucionistas por apresentarem uma taxa aparentemente elevada de substituições de bases nos seus genomas mitocondriais (García et al., 2000, 2002) e um novo padrão de substituições de aminoácidos em alguns genes *Hox* (Gutiérrez et al., 2007). Além disso, muitas de suas espécies apresentam genomas incomumente grandes (García et al., 2014).

Segundo García et al. (2002) e García (2006), vários eventos de especiação simultânea parecem ter sido importantes ao longo da história evolutiva de *Austrolebias*, que vem sendo estudada através de ferramentas morfológicas e moleculares (Costa, 1998, 2002, 2006; García et al., 2000, 2002, 2014; García, 2006; Loureiro, 2004). Embora a filogenia de *Austrolebias* ainda não seja estável e topologias de árvores variem de acordo com o conjunto de dados utilizados (Costa, 2006, 2010; García et al., 2014), existem alguns padrões claros sobre o monofiletismo de clados dentro do gênero. Na maioria dos complexos de espécies de *Austrolebias*, os subclados resultantes são distribuídos alopaticamente, sugerindo um padrão geral de especiação alopátrica (Loureiro et al., 2015).

De acordo com Costa (2006), o gênero inclui três espécies basais (*A. jaegari*, *A. gymnoventris* e *A. luteoflammulatus*) e cinco grupos de espécies (*A. robustus*, *A. elongatus*, *A. alexandri*, *A. bellottii* e *A. adloffii*) (Fig. 1). De modo geral, muitos destes agrupamentos vêm sendo suportados também por dados moleculares (García et al, 2000; García, 2006), embora mais recentemente, García et al. (2014) tenham apresentado *A. gymnoventris* e *A. luteoflammulatus* como espécies derivadas, membros do complexo de espécies denominado *A. gymnoventris-luteoflammulatus*, que também inclui *A. quirogai*. De acordo com esta hipótese filogenética, o gênero *Austrolebias* encontra-se subdividido em cinco complexos de espécies, que constituem dois clados bem diferenciados (Fig. 2): o clado I integra o complexo de espécies *A. alexandri-affinis*, com *A. nigripinnis* e *A. patriciae* ocupando um posicionamento basal; o clado II incluiu quatro outros complexos de espécies bem suportados, que colapsam na forma de uma politomia basal: clado II.1, *A. bellottii-robustus*; clado II.2, *A. gymnoventris-luteoflammulatus-quirogai*; clado II.3, *A. elongatus* e clado II.4, *A. adloffii-viarius*.

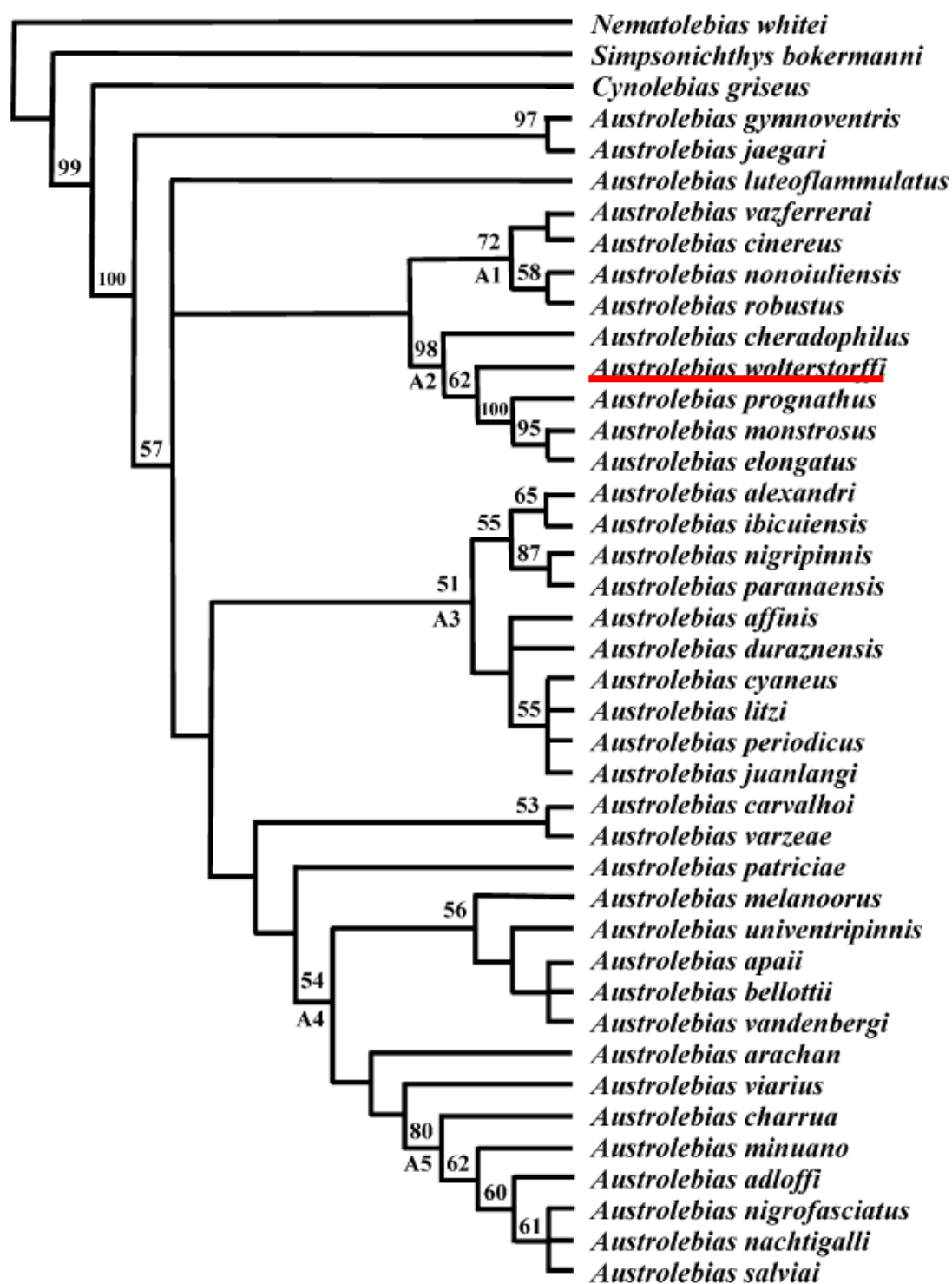


Figura I Árvore de consenso estrito entre dois cladogramas de máxima parcimônia obtidos para diferentes espécies de *Austrolebias* com base na análise de caracteres morfológicos, com o posicionamento de *A. wolterstorffi* destacado. Retirado de Costa (2006).

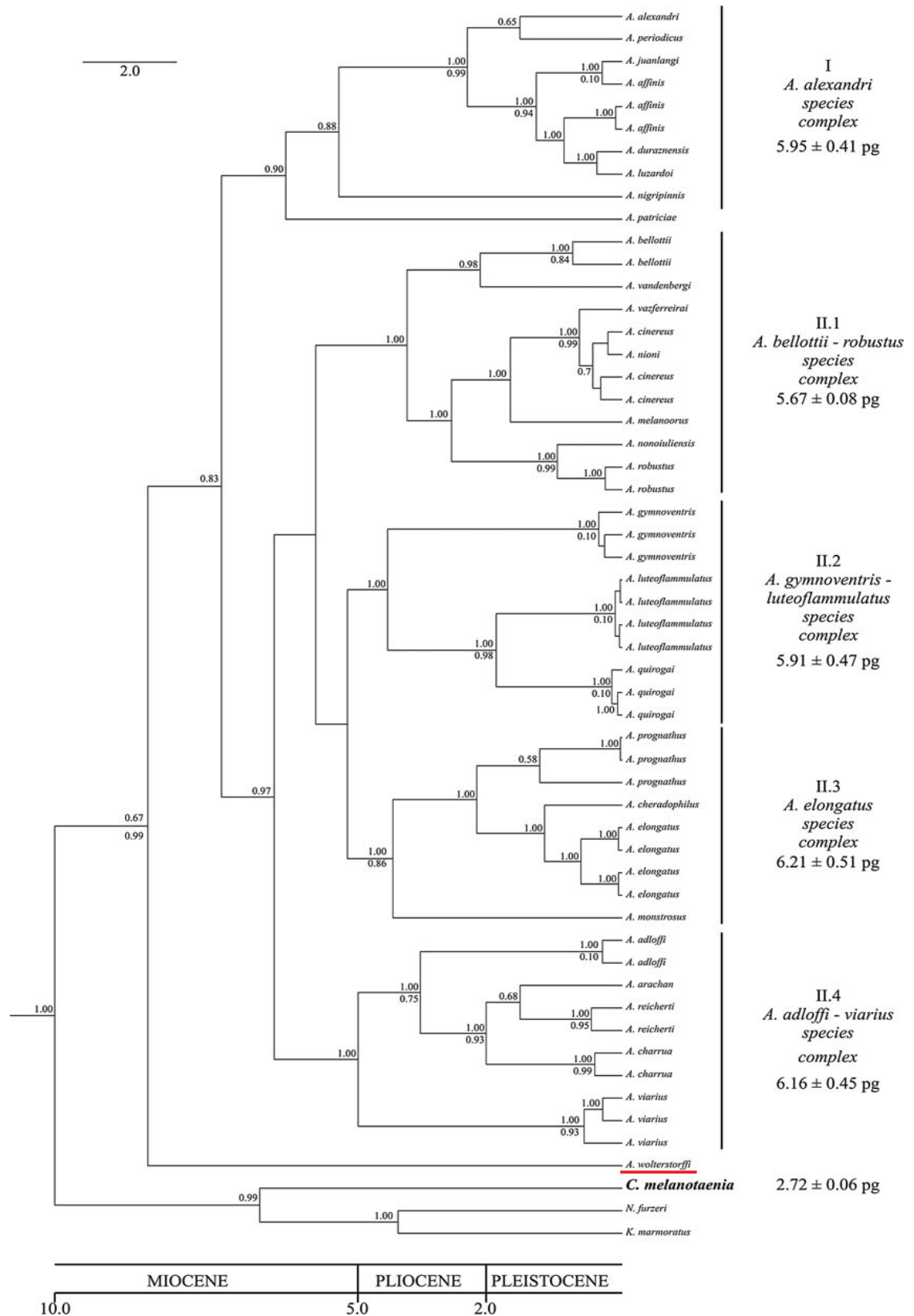


Figura II Topologia da árvore bayesiana reconstruída com base em seqüências do gene mitocondrial citocromo-b de diferentes espécies de *Austrolebias*, com o posicionamento de *A. wolterstorffi* destacado. Retirado de Garcia et al. (2014).

O grupo de espécies *A. elongatus*

De modo geral, o grupo de espécies *A. elongatus* é altamente apoiado por dados morfológicos (Costa, 2006) e moleculares (García et al., 2002), e inclui cinco espécies: *A. cheradophilus*, *A. wolterstorffi*, *A. prognathus*, *A. monstrosus* e *A. elongatus*. Este clado se distingue dos demais grupos de espécies dentro de *Austrolebias* por possuir características sinapomórficas evidentes como: escamas ausentes acima da base da nadadeira anal, pelo menos em fêmeas; escamas ausentes na porção anterior da região frontal; osso pélvico reduzido; aproximadamente 50-75 escamas em série longitudinal (exceto em *A. wolterstorffi*, com 31-35 escamas, o que costuma ser considerado uma reversão), e órgãos de contato proeminentes na maioria dos raios da nadadeira peitoral (que também não está presente em *A. wolterstorffi*, o que também costuma ser interpretado como uma reversão). A monofilia deste grupo de espécies foi, entretanto, questionada por García et al. (2014), que apresentou *A. wolterstorffi* como uma ramificação basal de *Austrolebias* (Fig. 2).

Espécies do grupo de *A. elongatus* podem atingir um tamanho grande (cerca de 70-120 mm CP) em comparação às demais espécies de Rivulidae, sendo consideradas as maiores (Costa; Cheffe, 2001). Devido especialmente a esta característica, estas espécies já foram incluídas em *Megalebias*, gênero que foi recentemente invalidado e sinonimizado com *Austrolebias* (Costa, 2006). Isso ocorreu ainda que análises morfológicas tenham recuperado uma topologia em que espécies de *Megalebias* seriam mais intimamente relacionadas com *Cynolebias* do que com *Austrolebias*, como são atualmente definidos (Loureiro, 2004).

Como espécies grandes costumam ser mais raras do que espécies menores (Costa, 2009), provavelmente em função da maior demanda de energia (Laufer et al., 2009; Arim et al., 2010), estão ainda mais sujeitas a fortes flutuações em suas frequências gênicas, em função da deriva genética. Os tamanhos populacionais potencialmente menores também podem estar associados a maiores riscos de extinção. De fato, pelo menos quatro das cinco espécies de *Austrolebias* incluídas no grupo de espécies de *A. elongatus*, encontram-se, atualmente, sob ameaça de extinção (*A. monstrosus* constitui, até o momento, a única exceção) (Loureiro et al., 2013; Volcan et al., 2015).

Austrolebias wolterstorffi

Dentre os peixes anuais, *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl 1924) é uma das espécies de maior porte (até 105 mm de comprimento) (Porciuncula et al., 2006), apresentando dimorfismo sexual e machos maiores que as fêmeas (Fig. 3). De acordo com Costa (2006), esta espécie se distingue das demais espécies do grupo *A. elongatus* por ter 31-35 escamas na série longitudinal (vs. cerca de 50-75), órgãos de contato minúsculos no raio superior da nadadeira peitoral em machos (vs. órgãos de contato proeminentes na maioria dos raios da nadadeira peitoral), e sete raios branquiostegais (contra seis). Esta espécie se alimenta principalmente de moluscos e é o mais especializado dos *Austrolebias* moluscívoros (Costa, 2009).

Austrolebias wolterstorffi tem uma das maiores gamas de distribuição do gênero (~ 50.000 km²), ocorrendo a partir do norte da Laguna dos Patos até o sul da Lagoa Mirim. Ainda assim, é considerada Criticamente Em Perigo (CR) de extinção pelos livros vermelhos da fauna ameaçada de extinção do Rio Grande do Sul (Reis et al., 2003) e do Brasil (Rosa & Lima 2008; ICMBio, 2013), devido à perda e degradação de seu habitat e a sua limitada área de distribuição. No entanto, até mesmo o seu posicionamento filogenético é, ainda, controverso, e embora estudos clássicos (Costa, 2006; García et al., 2002) costumam apresentá-la como membro do grupo de *A. elongatus*, a análise recentemente realizada por García et al. (2014) apresentou a mesma como basal aos demais complexos de espécies de *Austrolebias*.



Figura III Dimorfismo sexual em *A. wolterstorffi* (macho acima; fêmea abaixo). Foto: Daiana Garcez

O sistema de drenagens Patos-Mirim

O sistema de drenagens Patos-Mirim, localizado no sul do Brasil, é uma das áreas com maior número de espécies endêmicas de peixes anuais da região subtropical do Neotrópico (Costa, 2002). Para esta região, foi relatada a existência de alta variabilidade intraespecífica a nível morfológico, cromossômico e genético em populações de peixes anuais de pelo menos dois táxons: *A. luteoflamulatus* Vaz-Ferreira et al., 1964 (Reichert, 1994; Wildekamp, 1995; Loureiro, 1996; D'Anatro; Loureiro, 2005) e *A. adloffii* Ahl, 1922 (Vaz-Ferreira; Melgarejo, 1984; Loureiro, 1996; García et al., 1993, 1995, 2000;). Esta última, por exemplo, foi subdivida em três espécies (Costa; Cheffe, 2001).

Particularmente, a região costeira do leste da América do Sul foi impactada pelas transgressões e regressões marinhas durante o Pleistoceno e pós-Pleistoceno, resultando em modificações e fragmentações (Sprechman, 1978). Lopes et al. (2005) projetam a ocorrência de transgressões na planície costeira do Rio Grande do Sul para os períodos de: 1) 1,6 Mya; 2) 445-325 Kya; 3) 125-80 Kya; e 4) 6 Kya. Segundo Loureiro (2004), como a última destas transgressões é muito recente, muitas das espécies de peixes anuais dessa costa, assim como sua variabilidade intraespecífica, podem ter origem relativamente recente. Entretanto, questões sobre a origem da grande diversidade Neotropical só podem ser abordadas à luz das relações evolutivas entre as diferentes unidades taxonômicas ou populacionais.

Durante este período, a planície costeira do Rio Grande do Sul foi retrabalhada, na forma de quatro grandes sistemas deposicionais Laguna-Barreira. O Sistema Depositional Laguna-Barreira I da planície costeira, onde se encontra o município de Porto Alegre sofreu o efeito dos eventos transgressivos-regressivos que ocorreram há aproximadamente 400 mil anos atrás. O próximo evento transgressivo-regressivo pleistocênico ocorreu entre a Lagoa Mirim e o norte da Lagoa Mangueira, gerando o Sistema Depositional Laguna-Barreira II (entre Osório e Lagoa Mirim) e consequente formação desta última (~ 325 mil anos atrás), muito semelhante ao Sistema Depositional Laguna-Barreira III associado ao terceiro evento transgressivo-regressivo pleistocênico (~ 120 mil anos atrás), que foi responsável pela implantação final da Lagoa dos Patos, ocorrendo do município de Torres até o Chuí. O mais recente sistema Depositional Laguna-Barreira IV se desenvolveu durante o Holoceno, como consequência da última grande transgressão pós-glacial, e levou à formação dos cordões litorâneos que podem ser observados ao norte de Tramandaí e ao sul da cidade de Rio Grande (Tomazelli; Villwock, 2005).

Diversos dados geológicos também sustentam a ocorrência de cenários de transgressões e regressões marinhas durante o Quaternário na região da Planície Costeira do leste do Uruguai (Montaña; Bossi, 1995). Estes autores citam três grandes momentos em que o nível do mar teria subido nesta região durante os períodos interglaciais: (1) há 110 mil anos atrás, as águas do oceano atingiram vários quilômetros na costa, atingindo o oeste do Departamento de Rocha, no Uruguai; (2) um segundo registro de evento de transgressão e regressão marinha ocorreu há 30 mil anos atrás; (3) finalmente, um último evento teria acontecido há 5 mil anos atrás.

Atualmente, a região da Planície Costeira apresenta inúmeros pequenos charcos (áreas úmidas temporárias) (Maltchik et al., 2004), que servem de habitat para peixes anuais. Entretanto, a extensão destes charcos vem sendo amplamente reduzida, em virtude da expansão de atividades agrícolas ou urbanas, ou mesmo devido à construção e duplicação de estradas (Fontana et al., 2003; Volcan et al., 2009, 2010; Lanés & Maltchik, 2010). De fato, ainda que áreas úmidas comumente apresentem elevada produtividade e diversidade biológica (Mitsch; Gosselink, 2000), sendo muito importantes na estabilização das condições climáticas, no armazenamento de carbono e água, e no controle de inundações (Lanés, 2011), essas áreas encontram-se entre os ecossistemas mais degradados e vulneráveis do planeta (Amezaga et al., 2002). Cerca de 90% das áreas úmidas do sul do Brasil desapareceram ou se fragmentaram devido às atividades agrícolas, em especial a orizicultura e a expansão urbana. Dentre os tipos de áreas úmidas, as áreas úmidas temporárias são especialmente vulneráveis, devido ao tamanho reduzido, pouca profundidade e ao fato de encontrarem-se secas durante parte do ano (Dudley, 2006).

Em suma, dadas as peculiaridades ecológico-evolutivas do peixe anual ameaçado de extinção *A. wolterstorffi* em face à sua distribuição limitada e ao putativo isolamento populacional que ocorre através do sistema de drenagens Patos-Mirim, torna-se importante a realização de estudos científicos a fim de avaliar os níveis de diversidade e estruturação genética dentro e entre populações desta espécie, tentando auxiliar na reconstrução de sua história evolutiva. Estas informações são úteis no estabelecimento de estratégias de manejo e conservação, a serem futuramente propostas com vistas à redução da atual crise de biodiversidade (Berois et al., 2015), e à contenção de todos os impactos negativos a ela associados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo dessa dissertação é avaliar os níveis de diversidade e estruturação dentro e entre populações de *Autrolebias wolterstorffi* ao longo de toda sua área de distribuição, contribuindo para a reconstrução de sua história evolutiva.

Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de diversidade em diferentes populações de *A. wolterstorffi*;
- Analisar a estruturação interpopulacional de *A. wolterstorffi* ao longo da bacia La Plata e do sistema de drenagens Patos-Mirim;
- Avaliar a presença de diversidade críptica em *A. wolterstorffi*;
- Reconstruir o cenário espaço-temporal associado à origem/invasão/colonização dessa espécie/grupo de espécies ao longo de sua área de distribuição.

HIPÓTESES

- Existência de níveis reduzidos de diversidade intrapopulacional, devido à presença de populações pequenas e isoladas;
- Existência de níveis pronunciados de diferenciação interpopulacional ao longo do sistema lagunar Patos-Mirim, devido à ausência de fluxo gênico entre populações sujeitas a altas taxas evolutivas;
- Presença de diversidade críptica dentro de *A. wolterstorffi*, que perfaz, na verdade, um complexo de espécies;
- A invasão/colonização/diversificação de *A. wolterstorffi* no sistema de drenagens Patos-Mirim está diretamente relacionada aos eventos de transgressão marinha que ocorreram na região desde o Mioceno.

Referências

- Ahl, E. Über einige neue Fische aus Südamerika. Zoologischer Anzeiger, v. 58, p. 358–361, 1924.
- Amezaga, J. M.; SantaMaría, L.; Green, A. J. Biotic wetland connectivity-supporting a new approach for wetland policy. Acta Oecologica, v. 23, n. 3, p. 213-222, 2002.
- Arim, M.; Abades, S. B.; Laufer, G.; Loureiro, M.; Marquet, P. Food web structure and body size trophic position and resource acquisition. Oykos, v. 119, n. 1, p. 147-153, 2010.
- Berois, N.; M. J. Arezo, M. J.; de Sá, R. O. 2014. The neotropical genus *Austrolebias*: An emerging model of annual killifishes. Cell and Developmental Biology 3: 136.
- Berois, N.; García, G.; de Sá, R. O. (Org.). Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.
- Cardozo, V. Tasa metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). 1999. Tesis de Maestría (PEDECIBA) – Universidad de la República, Montevideo.
- Carvalho, G. R.; Hauser, L. Molecular markers and the species concept; New techniques to resolve old disputes? Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 9, p. 379-382, 1999.
- Costa, W. J. E. M. Análise filogenética da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei). Revista Brasileira de Biologia, v. 50, p. 65-82, 1990.
- Costa, W. J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). Journal of Comparative Biology, v. 3, n.1, p.33-92, 1998.
- Costa, W. J. E. M.; Cheffe, M. M. Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna dos Patos System, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (Ahl)

(Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia*, v. 14, n. 2, p. 179-200, 2001.

Costa, W. E. J. M. Monophyly and phylogenetic relationships of the Neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, v. 2002, p. 916-927, 2002.

Costa, W. J. E. M. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive, morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, v. 1213, p. 1- 162, 2006.

Costa, W. J. E. M. Catalog of Aplocheiloid killifishes of the world. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 2008. 127p.

Costa, W. J. E. M. Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration Freshwaters*, v. 20, n. 2, p. 179-191, 2009.

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

Costa, W. J. E. M. Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Vertebrate Zoology*, v. 63, n. 2, p. 139-154, 2013.

D'Anatro, A.; Loureiro, M. Geographic variation in *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Journal of Fish Biology*, v. 67, n. 3, p. 849-865, 2005.

de Sá, R. O.; Berois, N.; García, G. Overview, Future Challenges, and Evolution of Annualism. In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.

- Dudley, D. W. The biology of temporary waters. Oxford University Press, 2006, 348 p.
- Errea, A.; Danulat, E. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. Environmental Biology of Fishes, v. 61, p. 261-268, 2001.
- Fontana, C. S.; Bencke G. A.; Reis R. E. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- Furness, A. I. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. Biological Reviews, 2015.
- García, G.; Scvortzoff, E.; Maspoli, M. C.; Vaz-Ferreira, R. Analysis of karyotypic evolution in natural population of *Cynolebias* (Pisces: Cyprinodontiformes, Rivulidae). Cytologia, v. 58, p. 85-94, 1993.
- García, G.; Scvortzoff, E.; Hernández, A. Karyotypic heterogeneity in South American killifishes of the genus *Cynolebias* (Pisces, Cyprinodontiformes: Rivulidae). Cytologia, v. 60, p. 103-110, 1995.
- García, G.; Wlasiuk, G.; Lessa, E. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Zoological Journal of the Linnean Society, v. 129, p. 93-110, 2000.
- García, G.; Alvarez-Valin, F.; Gomez, N. Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Biological Journal of the Linnean Society, v. 76, p. 49-59, 2002.
- García, G. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, v. 44, n. 1, p. 75-87, 2006.

García, G.; Gutiérrez, V.; Ríos, N.; Turner, B.; Santiñaque, F.; López-Carro, B.; Folle, G. Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, v. 142, p. 87-98, 2014.

García, G.; Ríos, N.; Gutiérrez, V. Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, v. 360 n. 1, p. 143-353, 2015.

García-Rodríguez, F.; Catineira, C.; Scharf, B.; Sprechmann, P. The relationship between trophic state and sea level variation in the Rocha Lagoon, Uruguay. *N. Jb. Geol. Paleont.*, v. 2002, n. 1, p. 27-47, 2002.

García-Rodríguez, F.; Witkowaki, A. Inferring sea level variation from relative percentages of *Pseudopodosira kosugii* in Rocha Lagoon, SE Uruguay. *Diatom Research*, v. 18, n. 1, p. 49-59, 2003.

Gillespie, J. H. Is the population size of a species relevant to its evolution? *Evolution*, v. 55, n. 11, p.2161-2169, 2001.

Gutiérrez, V.; Arezo, M. J.; García, G. Characterization of partial *Hox* genes sequences in annual fishes of the Cynolebiatinae subfamily (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 494-503, 2007.

Hrbek, T.; Larson, A. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A Molecular Phylogenetic and Biogeographic Perspective. *Evolution*, v. 52, n. 4, p. 1200-1216, 1999.

ICMBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2012. Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes Rivulídeos ameaçados de extinção. Brasília. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna->

brasileira/plano-de-acao/2833-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-rivulideos.html>. Acesso em: 19 nov. 2014.

Jowers, M. J.; Cohen, B. L.; Downie, J. R. The cyprinodont fish *Rivulus* (Aplocheiloidei: Rivulidae) in Trinidad and Tobago: molecular evidence for marine dispersal, genetic isolation and local differentiation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 46, n. 1, p. 48-55, 2008.

Lanés, L. E. K.; Maltchik, L. Discovery of the Critically Endangered annual killifish *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in Lagoa do Peixe National Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Threatened*, v. 2, n. 11, p. 1282-1285, 2010.

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

Laufer, G.; Arim, M.; Loureiro, M.; Piñeiro-Guerra, J. M.; Clavijo-Baquet, S.; Fagúndez, C. Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, n. 1, p. 77-86, 2009.

Loureiro, M. Osteology, morphology and female choice in species of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). 1996. MSc. Theisi dissertation, University of Richmond, VA.

Loureiro, M. Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). 2004. Tesis de Doctorado (PEDECIBA) – Universidad de la República, Montevideo.

Loureiro, M., M. Zarucki, I. González, N. Vidal, and G. Fabiano. 2013. Peces continentales. Pp. 91–112, In: *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay*. Vertebrados, moluscos

continentales y plantas vasculares, eds. A. Soutullo, C. Clavijo, and J.A. Martínez-Lanfranco. snap/dinama/mvotma y dicyt/mec, Montevideo. 222pp.

Loureiro, M.; de Sá, R. O. Diversity of Aplocheiloidei. In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.

Loureiro, M.; Borthagaray, A.; Hernández, D.; Duarte, A.; Pinelli, V.; Arim, M. Austrolebias in Space: Scaling from Ponds to Biogeographical Regions. In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.

Maltchik, L.; Rolon, A. S.; Guadagnin, D. L.; Stenert, C. Wetlands of Rio Grande do Sul, Brazil: a classification with emphasis on plant communities. Acta Limnológica Brasileira, v. 16, n. 2, p. 137-151, 2004.

Mitsch, W. J., Gosselink, J. G. Wetlands. John Wiley & Sons, New York, 2000. 920 p.

Montaña, J. R.; Bossi, J. Geomorfología de los humedales de la cuenca de la Laguna Merín en el departamento de Rocha. Facultad de Agronomía, v. 2, p. 1-32. Montevideo, 1995.

Murphy, W. J.; Collier, G. E. A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. Molecular Biology and Evolution, v. 14, p. 790-799, 1997.

Nelson, J. S. Fishes of the world. John Wiley and Sons. 2006, 601 p.

Nielsen, D. T. B.; Pillet, D. *Austrolebias accorsii*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae) from the upper río Grande basin, Amazon basin, Bolivia. aqua, International Journal of Ichthyology, v. 21, n. 4, p. 172-179, 2015.

Parenti, L. R. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). Bul. Am. Mus. Nat. Hist., v. 168, p. 335-557, 1981.

Porciuncula, R. A.; Quintela, F. M.; Loebmann, D. Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae, *Austrolebias minuano* Costa & Cheffe, 2001 and *Megalebias wolterstorffi* (Ahl, 1924): new species records at Rio Grande city, Rio Grande do Sul state, Brazil. Check List, v. 2, p. 44-46, 2006.

Reichert, J. J. Listado, datos bibliográficos y distribución de las especies del genero *Cynolebias* Steindachner 1876 (Cyprinodontiformes, Rivulidae) en la República O. del Uruguay. Acuariología Comunicaciones Ictiológicas, v. 6, p. 1-12, 1994.

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. (Eds.). Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 632 pp.

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

Sanmartín, I. and F. Ronquist. 2004. Southern Hemisphere biogeography inferred by event-based models: Plant versus animal patterns. Systematic Biology 53:216–243.

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. Acessado em Agosto de 2014.

Sprechmann, P. The paleoecology and paleogeography of the uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. Zitteliana, v. 4, p. 3-72, 1978.

Tomazelli, L. J.; Villwock, J. A. Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. GRAVEL, n. 3, p. 109-115, 2005.

Vaz-Ferreira, R.; Sierra, B.; Paulete, S. S. Ecoetologia de La reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Archivos de la Sociedad Biológica, Montevideo, v. 26, p. 44-49, 1964.

Vaz-Ferreira, R.; Melgarejo, A. R. La distribución de las especies Del género *Cynolebias* Steindachner 1876, en El Uruguay, com notas sobre *C. alexandri* Castello y Lopez, 1974. Bol. Soc. Zool., Uruguay, v. 2, p. 41-46, 1984.

Volcan, M. V.; Lanés, L. E. K.; Gonçalves, A. C. Threatened fishes of the world: *Austroebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe, 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Environmental Biology of Fishes, v. 86, n. 3, p. 443-444, 2009.

Volcan, M. V.; Lanés, L. E. K.; Cheffe, M. M. Distribuição e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no município do Chuí, Brasil. Biotemas (UFSC), v. 23, n. 4, p. 51-58, 2010.

Volcan, M. V.; Fonseca, A. P.; Robaldo, R. B. Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: rivulidae), confined in a natural environment. Journal of Threatened Taxa, v. 3, p. 1864-1867, 2011.

Volcan, M. V.; Lanés, Luis Esteban Krause ; Gonçalves, Ândrio Cardozo ; Guadagnin, D. L. . Annual fishes (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and conservation. In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.

Whitlock, M. C. Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. Evolution, v. 54, n. 6, p. 1855-1861, 2000.

Wildekamp, R. H. A world of killies: atlas of the oviparous cyprinodontiform fishes of the world. American Killifish Association, Mishawaka, v. 2, 384 p. 1995.

CAPÍTULO ÚNICO

High levels of genetic differentiation and incipient speciation within the Critically Endangered Neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

Manuscrito a ser submetido para a revista Molecular Ecology.

High levels of genetic differentiation and incipient speciation within the Critically Endangered Neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

Daiana Kaster Garcez¹; Crislaine Barbosa²; Marcelo Loureiro^{3,4}; Matheus Vieira Volcan⁵;
Daniel Loebmann¹; Lizandra Jaqueline Robe¹

1 – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 - Curso de Ciências Biológicas, Bacharelado, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 - Sección Zoología Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

4 - Departamento de Ictiología, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay.

5 - Instituto Pró-Pampa (IPPampa), Laboratório de Ictiologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Austrolebias wolterstorffi is a Critically Endangered species of annual fish differentiated by its larger sizes and wide distribution range, occurring in isolated temporary ponds from the north of the Patos Lagoon to the south of the Mirim Lagoon. These unique properties and the putative basal positioning in the phylogenetic tree of *Austrolebias* makes this one of the top species at the conservation priority list of its genus. So, this study aims to evaluate the levels of genetic diversity and structure within *A. wolterstorffi*, in order to promote the adoption of effective strategies in the conservation of the target species. In this sense, 798 bp of the mitochondrial cytochrome b gene were characterized and analysed for a set of 94 specimens of *A. wolterstorffi* collected along the entire distribution range of the species. Our analysis showed that, in addition to several cases of significantly high levels of differentiation among individual populations, in an isolation-by-distance pattern of divergence, *A. wolterstorffi* is subdivided into at least five different groups of population along the Patos-Mirim lagoon system. These groups differed by a minimum of 0.7% and a maximum of 1.7% of corrected nucleotide distances, and did not share any haplotype, suggesting the occurrence of incipient speciation as a consequence of allopatric fragmentation. The phylogenetic tree and the diversity values also supported the Uruguayan haplogroup as derived in relation to the Brazilian ones. So, although the taxonomic status of each of the detected population units still needs to be further addressed, independent conservation strategies must be taken in each of the five major areas covered by this study, four of which are located in Brazil.

Key-words: allopatric fragmentation; cryptic speciation; Patos-Mirim lagoon system; genetic structuring.

Introduction

Annual fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei) are a fascinating group of freshwater fishes which possess particular developmental, ecological and physiological adaptations. They have an unusually short life cycle of less than a year, which is entirely correlated to the inhabited seasonal ponds of water (Loureiro & de Sá 2015). The non-overlapping generations in time and space make annual fishes excellent models for studies of evolution. Furthermore, their patchy distribution provides ideal conditions for studying the underlying evolutionary mechanisms (e.g., genetic drift, gene flow, selection, etc.) that can result in rapid divergence between populations, or even allopatric speciation with or without morphological differentiation (de Sá *et al.* 2015).

Rivulidae is one of the most diverse families of Neotropical annual fishes, with about 350 described species living in South and Central America and in the southern United States (Costa 2008). Within this family, *Austrolebias* encompasses at least 43 annual species, distributed along the Paraná-La Plata, Amazonas and Patos-Mirim basins (Costa 2006; Nielsen & Pillet 2015). This genus is particularly diverse in southern Brazil and Uruguay, especially in the Patos-Mirim lagoon system (Costa 2006). Nevertheless, several of these species are endangered of extinction, which is related not only with the frequently restricted and patchy distribution, or with the characteristically low vagility of most species, but principally with the loss and fragmentation of their habitats (Costa 2002; Rosa & Lima 2008; ICMBio 2013; Volcan *et al.* 2015).

Austrolebias wolterstorffi is one of the biggest species of annual fishes and has one of the largest distribution range in the genus (~50,000 km²), occurring in temporary ponds from the north of the Patos Lagoon to the south of the Mirim Lagoon, along Southern Brazil and

Uruguay (Loureiro *et al.* 2015). Due to their higher energy demands, bigger species of annual fishes tend to be even rarer than smaller ones (Costa 2009; Laufer *et al.* 2009; Arim *et al.* 2010), which makes them special targets of random genetic drift and even extinction. In fact, *A. wolterstorffi* is considered as Critically Endangered (CR) (Reis *et al.* 2003; Rosa & Lima 2008; ICMBio 2013) due to its peculiar evolutionary properties and to the loss and degradation of its habitats. Nevertheless, despite the incipient promotion of studies aiming to enhance the knowledge of annual fishes (ICMBio, 2013), even the phylogenetic position of *A. wolterstorffi* is still controversial. In this sense, although classical studies (Costa 2006 and 2010) tend to present this species as a member of the *A. elongatus* group, recent analysis (García *et al.* 2014) presented this species as an early offshoot within its genus.

In conservation efforts, it is generally accepted that species selection should be conducted in the sense of prioritize species separated by the highest number of steps on a cladogram (Hedenäs 1996). The putative early offshoot of *A. wolterstorffi* (García *et al.* 2014), associated with its characteristic autapomorphies and reversals (Costa 2006) suggests this as one of the top species at the conservation priority list within *Austrolebias* (ICMBio 2013). Moreover, although the wide geographical distribution of this species may suggest it could recover alone without further measures, the joint action of high levels of genetic drift, frequent bottlenecks, inbreeding and low levels of gene flow may have lead not only to population differentiation, but even to unrecognized speciation, which could widely affect the persistence of this targeting unit. So, this study aims to assess the levels of diversity and the genetic structure within and among populations of *A. wolterstorffi*, trying to help in the reconstruction of its evolutionary history and in the establishment of management and conservation strategies.

Materials and methods

Sampling

This study includes a total of 93 individuals of *A. wolterstorffi* collected between 2014 and 2015 in 20 sampling locations distributed along the entire known distribution range of this species (Loureiro *et al.* 2015; Volcan *et al.* 2015), that is, Patos-Mirim lagoon system (Table 1; Figure 1). Samplings in Brazil 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 (process number 23116.005828/2014-66). The fishes were collected in temporary ponds with the help of hand net, euthanized with an overdose of 3000mg/L of eugenol anesthetic and then fixed in 95% ethanol. The captured fishes were transferred to the Laboratório de Genética, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil or to the Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, where they were dissected. Caudal peduncle tissue was finally obtained from a total of 66 and 27 Brazilian and Uruguayan specimens, respectively (Table 1, see in "Additional Files").

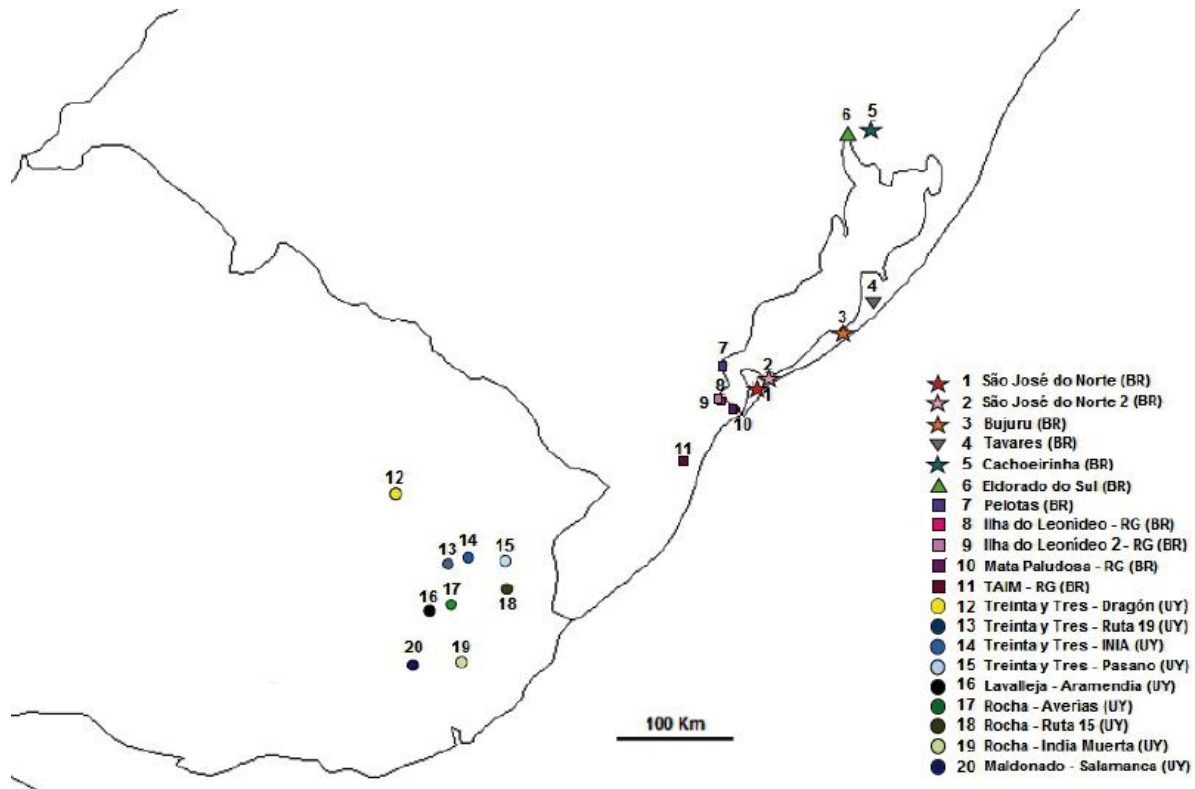


Figure 1 Sampling locations (numbered 1–20) of individuals of *Austrolebias wolterstorffi* along Brazil (samples 1-11) and Uruguay (samples 12-20). Different symbols were used to denote the sampling sites of each of the five haplogroups recovered in the Network.

DNA Manipulation

Total DNA was extracted from each individual from approximately 30 mg of muscular tissue, using a phenol/chloroform protocol (Sambrook *et al.* 1989). Approximately 800 bp of the mitochondrial cytochrome *b* (*cyt b*) gene were then amplified from each sample using the primers L14735 (5'-AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTA-3') and CB3-H (5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3') (Wolf *et al.* 1999; Palumbi *et al.* 1991). PCR reactions were carried out using 50–100 ng of DNA in a 25 μ L reaction, containing 1 \times buffer, 0.5 μ M of each primer, 0.25 mM of each dNTP, 3 mM of MgCl₂ and 1 U of Taq DNA polymerase. PCR conditions consisted of an initial stage of denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and

extension at 72°C for 60 s, and a final extension stage at 72°C for 10 min. To check whether the amplification was successful, 5 µL of the PCR product were applied to 0.8% agarose gel, stained with GelRed (Biotium). The amplified fragments were then purified with a solution of 7.5 M ammonium acetate (C₂H₇NO₂) and directly sequenced. Sequencing was performed in a Perkin-Elmer ABI Prism 377 Automated Sequencer (MACROGEN, Seoul, Korea) using the same amplification primers.

Data Analysis

First, electropherograms were assembled and edited in the Gap4 software of the Staden package (Staden 1996). The consensus sequences thus obtained had their identity confirmed using BLASTN (NCBI website), and were then aligned using the ClustalW algorithm, as implemented in Mega 6 software (Tamura *et al.* 2013). A single *cytb* sequence available for *A. wolterstorffi* in GenBank (access number AF245014) was then added to our intraspecific matrix, which totaled 94 x 798 bp in length. Each polymorphic site encountered along this alignment was individually checked and manually corrected, if necessary.

The DnaSP 5.10 software (Librado & Rozas 2009) was used to calculate the levels of genetic diversity within populations, as estimated from the average number of different haplotypes (H), the average number of nucleotide differences between haplotypes (k) and the haplotype (H_d) and nucleotide (π) diversities. This software was also employed in the evaluations of neutrality, as performed through the Tajima's D (Tajima 1989), Fu & Li's D* (Fu & Li 1993), Fu & Li's F* (Fu & Li 1993) and Fu's F_s (Fu 1997) tests.

The levels of genetic differentiation between populations were measured through F_{st} in Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), with significance evaluated through 10,000

random permutations. A Mantel test was further performed with these measures in order to verify the relationship between geographic and genetic distances. Finally, different hypothesis of population groupings were assessed through Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) (Dupanloup *et al.* 2002), in order to define the number and structure of the groups that are geographically homogeneous and maximally differentiated from each other. In this case, different hypothesis were evaluated through hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA), as performed in Arlequin, with 10,000 permutations. The optimal number of groups was determined from the pattern of FCT values as a function of K, in order to obtain the number of groups necessary for FCT to reach a plateau.

The relationships between haplotypes were inferred from haplotype networks generated by median-joining in the Network v.4.510 software (Bandelt *et al.* 1999). Additionally, phylogenetic analyses were performed using three main methods: (1) maximum likelihood (ML) as implemented in PhyML (Guindon *et al.* 2010), using the TrN+I+G nucleotide substitution model, as selected by the Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1974) implemented in jModelTest 2.1.7 (Posada 2008); (2) Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987) using MEGA 6, with a variation of the model selected by the AIC in jModelTest (TrN+G, with alpha set to 0.2210, as suggested by the jModelTest output); (3) Bayesian Inference (BI) employing MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.* 2012), with the HKY+I+G nucleotide substitution model, as selected by the AIC implemented in MrModelTest 2.3 (Nylander 2004) with the aid of PAUP 4.0a147 (Swofford 2002). ML search was implemented using a BioNJ starting-tree, with the best of NNI and SPR branch swapping. BI was conducted with two independent runs, each with four simultaneous chains, through 10,000,000 generations, sampling every 1,000 and discarding the first 25% as burn-in. Support was measured through 1,000 bootstrapping replicates in NJ and ML searches, and through posterior probability (PP)

in BI. In these three cases, sequences of *cytb* obtained for *A. nigrofasciatus*, *A. minuano* and *A. adloffii* (Table 1) were used as outgroups. The phylogenetic trees obtained through ML and BI were visualized and edited in FigTree 1.4.2 (Rambaut 2009).

Results

In this study, sequences spanning 798 bp of the mitochondrial *cytb* gene were characterized for 94 individuals of *A. wolterstorffi* collected at 20 different localities (Figure 1). Additionally, three individuals from the *A. adloffii* species complex belonging to the species *A. nigrofasciatus*, *A. minuano* and *A. adloffii* were included in the phylogenetic analyses, as outgroups. The intraspecific matrix of *A. wolterstorffi* encompassed 34 different haplotypes presenting 59 variable sites, of which 44 were parsimoniously informative. The general transition/transversion ratio was of the order of 2.62, 0.00 and 8.46 for the first, second and third codon positions, and the average empirical ACGT frequencies were 0.255, 0.259, 0.141 and 0.345, respectively. In this sense, AIC tests performed in both, jModelTest and MrModelTest, indicated the need of correcting for multiple hits, transitional and transversional substitution bias, inequality of nucleotide frequencies and heterogeneity of substitution rates among sites, in the form of the TrN+I+G and HKY+I+G nucleotide substitution models, respectively.

Table 2 summarizes the results of the nucleotide diversity and neutrality tests implemented individually for each sampling location, for the set of Brazilian and Uruguayan points, and for *A. wolterstorffi* taken as a whole. In general more than one haplotype was sampled in all except three locations where more than a single specimen was captured. In this sense, haplotype diversity values (H_d) were generally higher than 0.5. Conversely, the

individual nucleotide diversity values (π) were generally low, ranging from 0.000 to 0.0055, although the total nucleotide diversity of the species and the Brazilian grouping was at least twice higher (0.01234 ± 0.00039 ; 0.01264 ± 0.00044 , respectively). Compared to Brazil, the Uruguayan grouping had a quite smaller π (0.00177 ± 0.00030). As concerns the performed neutrality tests, only Pelotas presented statistically significant ($p < 0.001$) negative values for Tajima's D. All the other localities, including the Brazilian and Uruguayan groupings, and the species taken as a whole, did not present significant signs of deviation from neutrality.

Table 2 Genetic diversity estimates and neutrality tests performed for *A. wolterstorffi* as a whole, for each of the sampling localities, for Brazil and Uruguay groupings, and for each of the five haplogroups recovered in the Network.

Population	N	H	Hd/sd	π /sd	k	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F	Fu's Fs
Salamanca	1								
Rocha_179	5	3	0.700±0.218	0.00175±0.00055	1.40000	-0.17475	-0.17475	-0.17531	0.061
Treinta y Tres_19	3	2	0.667±0.314	0.00084±0.00039	0.66667				0.201
Treinta y Tres_INIA	2	1	0±0	0±0					
Treinta y Tres_Dragón	6	2	0.533±0.172	0.00067±0.00022	0.53333	0.85057	1.05247	1.02905	0.625
Rocha_Averías	2	2	1.000±0.500	0.00125±0.00063	1.00000				0
Rocha_India Muerta	4	2	0.667±0.204	0.00084±0.00026	0.66667	1.63299	1.63299	1.27657	0.540
Lavalleja_Aramendia	3	2	0.667±0.314	0.00251±0.00118	2.00000				1.609
Treinta y Tres_Pasano	1								
São José do Norte	10	4	0.644±0.152	0.00554±0.00208	4.42222	-0.17140	0.91211	0.72453	2.612
São José do Norte2	5	1	0±0	0±0					
Bujuru	4	1	0±0	0±0					
Tavares	12	5	0.667±0.141	0.00241±0.00073	1.92424	-0.12015	-0.50357	-0.45961	-0.311
Cachoeirinha	1								
Eldorado do Sul	3	2	0.667±0.314	0.00167±0.00079	1.33333				1.061
Pelotas	5	3	0.700±0.218	0.00439±0.00160	3.50000	-1.34891*	-1.18441	-1.27970	1.622
Ilha do Leonídeo	10	6	0.889±0.075	0.00549±0.00064	4.37778	0.14476	0.85584	0.76503	0.076
Ilha do Leonídeo2	12	4	0.803±0.063	0.00306±0.00042	2.43939	0.86869	1.31100	1.35773	1.420
Mata Paludosa	3	2	0.667±0.314	0.00251±0.00118	2.00000				1.609
TAIM	1								
Brazil	66	24	0.938±0.014	0.01264±0.00044	10.09044	-0.37039	-0.44830	-0.50069	-1.302
Uruguay	28	10	0.839±0.052	0.00186±0.00030	1.43915	-1.60402	-1.99718	-2.19408	-5.030
Haplogroup I	20	5	0.653±0.093	0.00375±0.00136	2.99474	-0.88260	0.77839	0.34277	1.916
Haplogroup II	12	5	0.667±0.141	0.00241±0.00073	1.92424	-0.12015	-0.50357	-0.45961	-0.311
Haplogroup III	3	2	0.667±0.314	0.00167±0.00079	1.33333				1.061
Haplogroup IV	31	12	0.905±0.027	0.00488±0.00049	3.89462	-1.23998	-1.29870	-1.50717	-1.876
Haplogroup V	28	10	0.839±0.052	0.00186±0.00030	1.43915	-1.60402	-1.99718	-2.19408	-5.030
Total	94	34	0.956±0.008	0.01273±0.00040	9.82384	-0.61420	-0.68530	-0.78735	-5.159

N, number of individuals; H, number of haplotypes; Hd, haplotype diversity; sd, standard deviation; π , nucleotide diversity; Tajima's D, Fu and Li's D, Fu and Li's F, Fu's Fs, neutrality tests. Significant values ($p < 0.05$) are indicated by an "*".

As concerns the genetic differentiation levels, from the 190 pairwise comparisons, 89 resulted in statistically significant values, of which 52 involved comparisons between Brazilian and Uruguayan localities, and 32 or five involved only Brazilian or Uruguayan localities, respectively. In most of the significant comparisons, F_{st} values were higher than 0.4, indicating the presence of high levels of genetic differentiation (Table 3). The sole localities that did not present any significant F_{st} value were Salamanca and Treinta y Tres Pasano, from Uruguay, and Cachoeirinha and Taim, from Brazil, all of which presented a single individual sampled. The Mantel test indicated the presence of a significant correlation between genetic and geographic distances ($r = 0.52$; $p < 0.000$). Even so, populations located less than 50 km apart, as Pelotas or Mata Paludosa in regard to Ilha do Leonídeo 1 and 2 presented moderated to high levels of genetic differentiation ($0.18199 \leq F_{st} \leq 0.40847$; $p < 0.05$).

The presence of subjacent genetic differentiation between populations or groups of populations was also revealed by the haplotype network, in which the presence of five distinct haplogroups could be inferred: haplogroup I, clustering haplotypes sampled at São José do Norte, Bujuru and Cachoeirinha; haplogroup II, with haplotypes sampled at Tavares; haplogroup III, with haplotypes sampled at Eldorado do Sul; haplogroup IV, with haplotypes sampled at Pelotas, Ilha do Leonídeo, Mata Paludosa and TAIM; and haplogroup V, grouping together all haplotypes sampled in Uruguay (Figure 2). Haplotypes of different haplogroups differed by a minimum range of 8-14 mutational steps, whereas the two haplotypes sampled at São José do Norte different by 11 mutational steps. No haplotype was shared by all populations (Fig. 2), and from the 34 sampled haplotypes, 28 were exclusive. A significant excess of low-frequency haplotypes was only observed for haplogroup V (Fig. 2), whose star-like pattern of ramification suggests an ancient population expansion.

Table 3 Pairwise FST values obtained in the comparisons between *A. wolterstorffi* sampling localities. Significant values ($p < 0.05$) are indicated by an “*”.

	Salamanca	Rocha_179	TreintayTres_19	TreintayTres_INIA	TreintayTres_Dragon	Rocha_Averias	Rocha_IndiaMuerta	Lavalleja_Aramendia	TreintayTres_Pasano	SJN	SJN2	Bujuru	Tavares	Cachoeirinha	Eldorado do Sul	Pelotas	Ilha do Leonideo	Ilha do Leonideo2	Mata Paludosa	TAIM
Salamanca	0																			
Rocha_179	-0,4	0																		
TreintayTres_19	-1	0,17373	0																	
TreintayTres_INIA	0	0,0411	-0,2	0																
TreintayTres_Dragon	0,2	0,43807*	0,41935	0,4	0															
Rocha_Averias	-1	0,14729	0,04545	0	0,44538	0														
Rocha_IndiaMuerta	0,55556	0,57111*	0,63636*	0,68	0,72947*	0,22581	0													
Lavalleja_Aramendia	-1	0,17808	0	-0,2	0,3617	-0,07143	0,50685*	0												
TreintayTres_Pasano	1	0,3	0,5	1	0,68	-1	-0,33333	0	0											
São José do Norte	0,625	0,74066*	0,71315*	0,68696*	0,7713*	0,68629*	0,75466*	0,70248*	0,65385	0										
São José do Norte2	1	0,94167*	0,98029*	1*	0,97465*	0,98243	0,97709*	0,94361*	1	0,02878	0									
Bujuru	1	0,93874*	0,97832*	1	0,97377*	0,97985	0,97531*	0,93798*	1	0,31718	1*	0								
Tavares	0,84292	0,86623*	0,8653*	0,8602*	0,88643*	0,85617*	0,88035*	0,85372*	0,85292	0,62868*	0,80067*	0,78789*	0							
Cachoeirinha	1	0,89231	0,94595	1	0,95789	0,92	0,95062	0,84615	1	-0,09459	1	1	0,71493	0						
Eldorado do Sul	0,85185	0,8623*	0,89286	0,90204	0,9204*	0,8716	0,91083*	0,83333	0,86667	0,73848*	0,9655*	0,95876*	0,86406*	0,89744	0					
Pelotas	0,65686	0,77968*	0,76305*	0,73635*	0,82784*	0,72727*	0,80665*	0,73529*	0,6875	0,74674*	0,88487*	0,86971*	0,83809*	0,76974	0,78172*	0				
Ilha do Leonideo	0,52927	0,66946*	0,64194*	0,60944*	0,71048*	0,61184*	0,69268*	0,63312*	0,57497	0,73151*	0,80946*	0,79529*	0,79832*	0,71387	0,69029*	0,18199*	0			
Ilha do Leonideo2	0,7158	0,77385*	0,76682*	0,75289*	0,80639*	0,75215*	0,80257*	0,75489*	0,74545	0,789*	0,88075*	0,87275*	0,84599*	0,83273	0,79649*	0,27764*	-0,02845	0		
Mata Paludosa	0,76923	0,83356*	0,85185	0,8481	0,89601*	0,81928	0,88119*	0,7931	0,7931	0,73333*	0,94932*	0,93955*	0,87008*	0,85	0,85437	0,50549*	0,28098*	0,40847*	0	
TAIM	1	0,86	0,92857	1	0,94483	0,89474	0,93651	0,78571	1	0,7226	1	1	0,87783	1	0,88889	0,32692	0,174	0,48644	0,64706	0

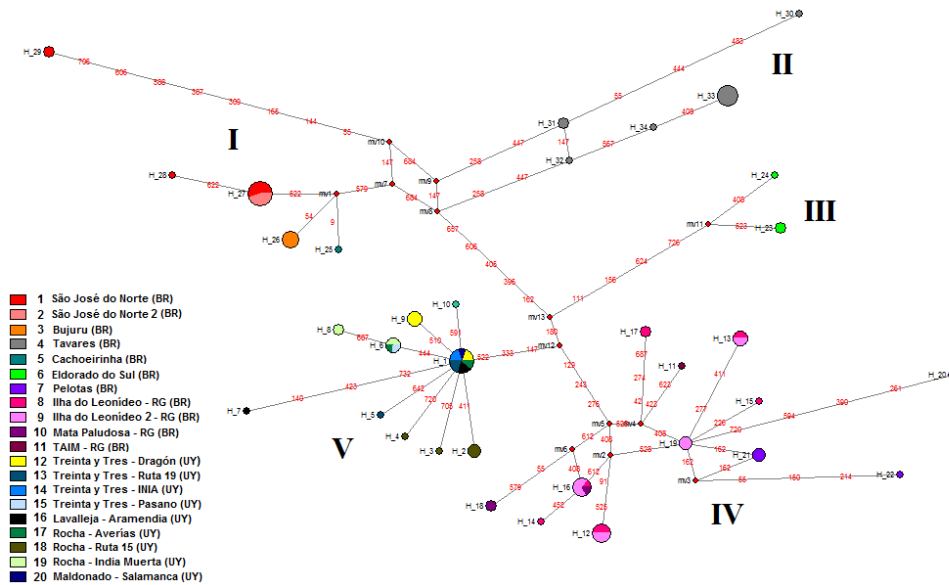


Figure 2 Median-joining network of the 34 cytb haplotypes (798 bp) sampled for *A. wolterstorffi* along its distribution range. The size of the circles is proportional to the haplotype frequency, and the colors refer to geographic origins, given in the Legend to the left, and in congruence with Fig. 1. Lines with numbers correspond to the position of each mutational step along the alignment.

The haplogroups structure suggested by the network was further confirmed by SAMOVA, according to which the hypothesis of subdivision of *A. wolterstorffi* in five groups with the composition listed above lead to a plateau in the FCT values. In fact, the AMOVA performed with this structure revealed that the five groups of populations were able to explain 76.37% of the encountered variation (Table 4). The topology of the phylogenetic tree also recovered a similar structure (Figure 3), with two highly supported clusters compatible with haplogroups III (PP = 1.00, bootstrap = 93 and 97, for NJ and ML, respectively) and IV (PP = 1.00, bootstrap = 70 and 93, for NJ and ML, respectively), one moderately supported cluster compatible with haplogroup V (PP = 0.97, bootstrap = 64 and 61, for NJ and ML, respectively), and one weakly supported cluster compatible with haplogroup II (PP = 0.58, bootstrap = 60 for NJ). Conversely, haplogroup I revealed polyphyletic in the Bayesian

phylogenetic tree. According to this tree, haplogroups IV and V, sampled at drainages located at the western margin of the Patos lagoon / eastern margin of the Mirim lagoon and at Uruguay, respectively (Fig. 1), constitute sister-clades (PP = 0.88, bootstrap = 49 for ML), whereas haplogroups I and II, sampled at the eastern margin of the Patos lagoon and at the northern range of *A. wolterstorffi* distribution, respectively, encompass early offshoots (PP = 0.97, bootstrap = 50 and 61, for NJ and ML, respectively).

Table 4 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) following the subdivision of *A. wolterstorffi* in five groups, as suggested by the Network and by SAMOVA.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	4	331.338	4.67216 Va	76.37%
Among populations within groups	15	35.741	0.32974 Vb	5.39%
Within populations	72	80.333	1.11574 Vc	18.24%
Total	91	447.412	6.11764	

d.f.= degrees of freedom

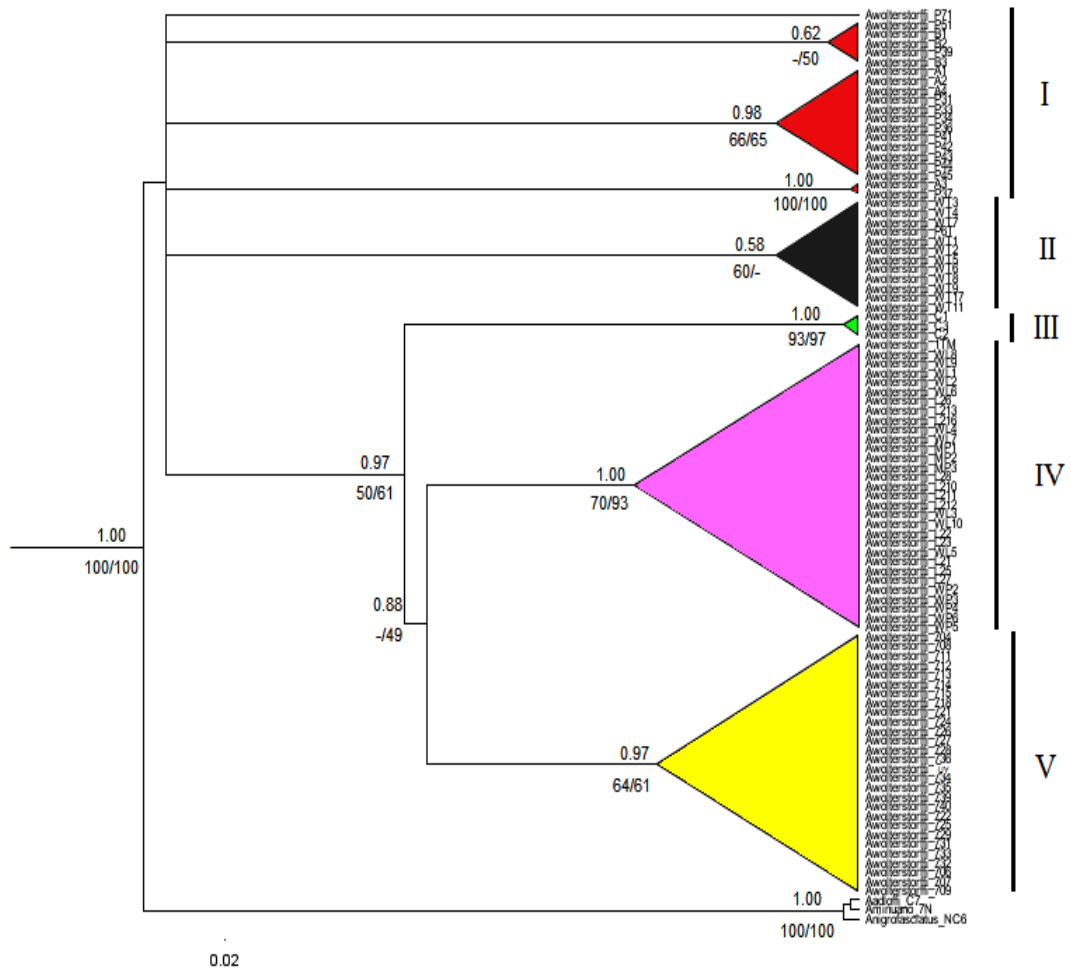


Figure 3 Bayesian tree topology generated using the HKY+I+G nucleotide substitution model based on the 94 sequences of cytb sampled for *A. wolterstorffi* and using *A. nigrofasciatus*, *A. minuano* and *A. adlofi* as outgroups. Numbers above the branches are the Bayesian posterior probability values of clades, whereas numbers below the branches are the bootstrap values obtained from the NJ and ML analyses, respectively. Clades encompassing the haplogroups recovered in the Network were collapsed in order to facilitate comprehension, and each haplogroup is represented by a different color.

The net TrN+G distance between the five haplogroups of *A. wolterstorffi* is presented in Table 5, where it can be seen that they differ by a minimum of 0.7% (as seen between haplogroups I and II) and a maximum of 1.7% (as seen between haplogroups I and IV; II and III; II and IV).

Table 5 Net sequence divergence between the five groups of populations detected for *A. wolterstorffi*, measured with the use of the TrN+G nucleotide substitution model, with confidence estimated by bootstrap. Average values are presented below the diagonal, whereas the standard deviation is presented above the diagonal.

	Haplogroup I	Haplogroup II	Haplogroup III	Haplogroup IV	Haplogroup V
Haplogroup I		0.003	0.005	0.005	0.005
Haplogroup II	0.007		0.005	0.005	0.005
Haplogroup III	0.016	0.017		0.004	0.004
Haplogroup IV	0.017	0.017	0.012		0.004
Haplogroup V	0.015	0.016	0.011	0.010	

Discussion

It is generally assumed that annual fishes may be subject to the concomitant action of a set of environmental, demographic and metabolic conditions commonly associated with high evolutionary rates (Whitlock 2000; Loureiro 2004), which can lead to a great variability between populations. In agreement with this, our analyses have shown that besides several cases of significantly high differentiation levels between populations, in an isolation-by-distance divergence pattern, *A. wolterstorffi* is subdivided into at least five different groups of populations in the Patos-Mirim lagoon system. Such a structure was suggested not only by the Network, but also by the SAMOVA, by the phylogenetic analyses and by the complete absence of haplotype sharing between groups, and is able to explain more than 76% of the variation detected for this species in the mitochondrial cytb gene. This suggests that vicariance has played an important role in the diversification of *A. wolterstorffi* populations, although some level of gene flow could occur, especially at short distances. In fact, historical allopatric fragmentations have been proposed as common processes along the evolution of Rivulidae (Jowers *et al.* 2008; García *et al.* 2009 and 2012; Ponce de León *et al.* 2014; García *et al.* 2015; Loureiro *et al.* 2015),

and may be an ongoing process within *A. wolterstorffi*. Bartáková *et al.* (2013), for example, found a strong genetic structure in the annual fish *Nothobranchius furzei* in Mozambique, suggesting its division into two major genetic groups, with ongoing expansion. However, in our study, population expansion signals were only found in the population of Pelotas and in the Uruguayan haplogroup. Garcia *et al.* (2015) also found a high population structure between four phylogroups in *A. bellottii* along the Parana-La Plata Basin, highlighting the importance of vicariant events in population diversification.

Recently, DNA-based approaches have helped in the discovery of high levels of genetic diversity and even to the putative recognition of cryptic speciation within annual fishes (Costa *et al.* 2013; García *et al.* 2015). In the case of *A. wolterstorffi*, the five population groups differ by a minimum of 0.7% corrected distance and a maximum of 1.7%, which allows raising the flag that at least some of them may constitute incipient species. This idea is supported by the fact that distances as small as 1.4% were previously reported for *cyt b* between different species of *Austrolebias* (García *et al.* 2000). Additionally, divergence within the range of 0 to 1.8% were reported among groups of the *A. bellottii* species complex from (García *et al.* 2015). Moreover, such a pattern of initially unrecognized speciation was previously reported for several other species of Neotropical annual fishes (Costa *et al.* 2013). Nevertheless, further careful morphological inspection needs to be performed in order to confirm the absence of morphological differentiation between the groups of populations of *A. wolterstorffi*, which may in fact constitute not a single species but a species complex. Anyway, it is likely that this complex presents a continuum of different speciation stages, in none of which speciation may have reached an “endpoint”, given by establishment of complete reproductive isolation.

Independent of the taxonomic status attributed to each of the five evolutionary units here detected, it is urging that independent strategies of conservation are conducted in each of the five major sampling areas covered by this study, four of which are located within Brazil. Although the levels of genetic diversity encountered for *A. wolterstorffi* as a whole or for each of the individual populations were relatively high, they are probably explained by gene flow in lowlands and by the putative higher mutational rates previously attributed to *Austrolebias* (García *et al.* 2015). In fact, similar levels of intrapopulational diversity were previously reported for other species of annual fishes (Bartáková *et al.* 2013; García *et al.* 2000 and 2015). Anyway, the fact that each of these areas embraces an independent genetic stock calls attention to the need of rapid interventions, principally in face of the rapid fragmentation and degradation of wetlands that are in course along the Brazilian territory (Volcan *et al.* 2015). This situation may decrease effective population sizes and gene flow, enhancing the action of random genetic drift and inbreeding, and increasing the risk of mutational meltdown and inbreeding depression, respectively (Frankham *et al.* 2013). Likewise, the periodic flooding of rivers and lagoons within the distribution range of *A. wolterstorffi* may also threaten the persistence of each of these independent evolutionary units, and signs of population admixture were encountered for the population of São José do Norte, which presents three different haplotypes, two of which differ by a minimum of 11 mutational steps from the other.

Finally, as concerns the spatio-temporal evolutionary scenario, our analyses suggest that Uruguayan populations are derived in relation to the Brazilian ones. Such inference is supported not only by the derived positioning of the Uruguayan haplogroup in the phylogenetic tree, but also by the lower diversity and

differentiation levels presented by these populations. Moreover, the early offshoot of haplogroups I and II and the derived positioning of haplogroup IV are at least partially compatible with the paleogeographical evolution of the South American Coastal Plain, since they locate mainly within the III Pleistocene and the IV Holocene Barrier-Lagoon Systems, respectively (Tomazelli & Villwock 2005; Montaña & Bossi 1995). Given the putative early offshoot of *A. wolterstorffi* within its genus (García *et al.* 2014), these results are also compatible with the idea that an *Austrolebias* ancestor occurred initially in areas of the La Plata, Negro or Patos Lagoons (Costa, 2010). Further studies, with the inclusion of nuclear markers and the adoption of a molecular clock perspective are needed in order to refine this picture.

So, although this study helped to promote the knowledge regarding the evolution of *A. wolterstorffi*, and evidenced some hidden taxonomic and conservation problems, it needs to be followed by innumerable other studies and initiatives in order to make a difference in the conservation of annual fishes, which encompass one of the most threatened vertebrate groups in Brazil (Rosa & Lima 2008; ICMBio 2013; Volcan *et al.* 2015). In this sense, it is important that the generated knowledge helps in the promotion and implementation of environmental education programs and encourages the creation of protected areas. Only the adoption of a whole set of actions can help in the conservation of this fascinating and biologically unique group of species.

References

- Akaike H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716-723.
- Arim M, Abades SB, Laufer G, Loureiro M, Marquet P. (2010) Food web structure and body size trophic position and resource acquisition. *Oykos*, **119**, 147-153.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Bartáková V, Reichard M, Janko K *et al.* (2013) Strong population genetic structuring in an annual fish, *Nothobranchius furzeri*, suggests multiple savannah refugia in southern Mozambique. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 196.
- Costa WJEM (2002) Monophyly and phylogenetic relationships of the Neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, **2002**, 916-927.
- Costa WJEM (2006) The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive, morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, **1213**, 1- 162.
- Costa WJEM (2008) *Catalog of Aplocheiloid killifishes of the world*. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 127p.
- Costa WJEM (2009) Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration Freshwaters*, **20**, 179-191.
- Costa WJEM (2010) Historical biogeography of Cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. *Journal of Biogeography*, **37**, 1995-2004.
- Costa WJEM (2013) Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Vertebrate Zoology*, **63**, 139-154.
- de Sá RO, Berois N, García G (2015) Overview, Future Challenges, and Evolution of Annualism. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. (ed: Berois N, García G, de Sá RO). pp. 1-342, Press Taylor & Francis group.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2581.
- Excoffier L, Lischer HEL (1993) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.
- Fu Y X, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693-709.
- Frankham R, Brook BW, Bradshaw CJA, Traill LW, Spielman D (2013) 50/500 rule and minimum viable populations: response to Jamieson and Allendorf. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 187–188.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- García G, Wlasiuk G, Lessa E (2000) High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **129**, 93-110.
- García G, Loureiro M, Berois N *et al.* (2009) Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a biosphere

- reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**, 620-635.
- García G, Gutiérrez V, Vergara J, Calviño P, Duarte A, Loureiro M (2012) Patterns of population differentiation in annual killifishes from the Paraná-Uruguay-La Plata basin: The role of vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography*, **39**, 1707-1719.
- García G, Gutiérrez V, Ríos N, Turner B, Santiñaque F, López-Carro B, Folle G (2014) Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, **142**, 87-98.
- García G, Gutiérrez V, Ríos N, de Sá RO (2015) Comparative Phylogeographic Patterns in *Austrolebias* from Different South American Basins In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (ed. Berois N, García G, de Sá RO). pp. 1-342C, CRC Press Taylor & Francis group.
- García G, Ríos N, Gutiérrez V (2015) Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, **360**, 143-353.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, **59**, 307-21.
- Hedenäs L (1996) How do we select species for conservation? *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Botánica*, **67**, 129-145.
- ICMBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2012) Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes Rivulídeos ameaçados de extinção. Brasília. Available in: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/plano-de-acao/2833-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-rivulideos.html>>. Access in 19 nov. 2014.
- Jowers MJ, Cohen B L, Downie JR (2008) The cyprinodont fish *Rivulus* (Aplocheiloidei: Rivulidae) in Trinidad and Tobago: molecular evidence for marine dispersal, genetic isolation and local differentiation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **46**, 48-55.
- Laufer G, Arim M, Loureiro M, Piñeiro-Guerra JM, Clavijo-Baquet S, Fagúndez C (2009) Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 77-86.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Loureiro M (2004) Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Tesis de Doctorado (PEDECIBA) – Universidad de la República, Montevideo.
- Loureiro M, de Sá RO (2015) Diversity of Aplocheiloidei. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (ed. Berois N, García G, de Sá RO). pp. 1-342, CRC Press Taylor & Francis group.
- Loureiro M, Borthagaray A, Hernández D, Duarte A, Pinelli V, Arim M (2015) *Austrolebias* in Space: Scaling from Ponds to Biogeographical Regions. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (ed: Berois N, García G, de Sá RO). pp. 1-342, CRC Press Taylor & Francis group.

- Montaña JR, Bossi J (1995) *Geomorfología de los humedales de la cuenca de la Laguna Merín en el departamento de Rocha*. Facultad de Agronomía, **2**, 1-32. Montevideo.
- Nielsen, DTB, 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*, **21**, 172-179.
- Nylander, JAA (2004) *MrModeltest v2. Program distributed by the author*. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) *The simple fool's guide to PCR*. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.
- Ponce de León JL, León G, Rodríguez R *et al.* (2014) Phylogeography of Cuban *Rivulus*: Evidence for allopatric speciation and secondary dispersal across a marine barrier. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **79**, 404-414.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.
- Rambaut A FigTree, ver. 1.3.1. Disponible in: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed February 2015).
- Reis RE, Lucena ZMS, Lucena CAS, Malabarba LR (2003) Peixes. In: *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul* (ed: Fontana CS, Bencke GA, Reis RE). pp. 632, Edipucrs, Porto Alegre.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, **61**, 1-4.
- Rosa RS, Lima FC (2008) Peixes. In: *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção* (ed: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP). Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, **5**, 233-241.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Tomazelli LJ, Villwock JA (2005) Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. *GRAVEL*, **3**, 109-115.
- Volcan MV, Lanés LEK, Gonçalves AC, Guadagnin D L (2015) Annual fishes (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and conservation. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (ed: Berois N, García G, de Sá RO). pp. 1-342, CRC Press Taylor & Francis group.

- Whitlock MC (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution*, **54**, 1855-1861.
- Wolf C, Rentsch J, Hübner P (1999) PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1350-1355.

Additional files

Table 1 Summary of analyzed material.

Species	Identification	Population	Latitude	Longitude
<i>A. wolterstorffi</i>	1A	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	2A	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	3A	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	4A	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P31	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P33	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P34	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P36	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P37	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P39	São José do Norte	-31.9172	-51.94305
<i>A. wolterstorffi</i>	P41	São José do Norte	-31.88016	-51.862027
<i>A. wolterstorffi</i>	P42	São José do Norte	-31.88016	-51.862027
<i>A. wolterstorffi</i>	P43	São José do Norte	-31.88016	-51.862027
<i>A. wolterstorffi</i>	P44	São José do Norte	-31.88016	-51.862027
<i>A. wolterstorffi</i>	P45	São José do Norte	-31.88016	-51.862027
<i>A. wolterstorffi</i>	1B	Bujuru	-31.5272	-51.291
<i>A. wolterstorffi</i>	2B	Bujuru	-31.5272	-51.291
<i>A. wolterstorffi</i>	3B	Bujuru	-31.5272	-51.291
<i>A. wolterstorffi</i>	P51	Bujuru	-31.5272	-51.291
<i>A. wolterstorffi</i>	P71	Cachoeirinha	-29.957052,	-51.080108
<i>A. wolterstorffi</i>	P6T	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT1	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT2	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT3	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT4	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT5	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT6	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT7	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT8	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT9	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT11	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	WT17	Tavares	-31.291687,	-51.081523
<i>A. wolterstorffi</i>	1C	Eldorado do Sul	-30.003054,	-51.269481
<i>A. wolterstorffi</i>	2C	Eldorado do Sul	-30.003054,	-51.269481
<i>A. wolterstorffi</i>	3C	Eldorado do Sul	-30.003054,	-51.269481
<i>A. wolterstorffi</i>	WP2	Pelotas	-31.778426,	-52.231411
<i>A. wolterstorffi</i>	WP3	Pelotas	-31.778426,	-52.231411

<i>A. wolterstorffi</i>	WP4	Pelotas	-31.778426, -52.231411
<i>A. wolterstorffi</i>	WP5	Pelotas	-31.778426, -52.231411
<i>A. wolterstorffi</i>	WP6	Pelotas	-31.778426, -52.231411
<i>A. wolterstorffi</i>	1MP	Rio Grande	-32.129433, -52.152127
<i>A. wolterstorffi</i>	2MP	Rio Grande	-32.129433, -52.152127
<i>A. wolterstorffi</i>	3MP	Rio Grande	-32.129433, -52.152127
<i>A. wolterstorffi</i>	WL1	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL2	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL3	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL4	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL5	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL6	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL7	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL8	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL9	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	WL10	Rio Grande	-32.050478, -52.227949
<i>A. wolterstorffi</i>	L21	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L22	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L23	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L25	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L26	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L27	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L28	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L210	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L211	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L212	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L213	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	L216	Rio Grande	-32.053276 -52.230917
<i>A. wolterstorffi</i>	1TM	Taim	-32.546597, -52.517014
<i>A. wolterstorffi</i>	704	Uruguai	-34.08445 -54.60575
<i>A. wolterstorffi</i>	706	Uruguai	-33.502216 -53.88416
<i>A. wolterstorffi</i>	707	Uruguai	-33.502216 -53.88416
<i>A. wolterstorffi</i>	708	Uruguai	-33.502216 -53.88416
<i>A. wolterstorffi</i>	709	Uruguai	-33.502216 -53.88416
<i>A. wolterstorffi</i>	711	Uruguai	-33.502216 -53.88416
<i>A. wolterstorffi</i>	724	Uruguai	-33.616983 -54.31013
<i>A. wolterstorffi</i>	725	Uruguai	-33.616983 -54.31013
<i>A. wolterstorffi</i>	729	Uruguai	-34.05613 -54.2417
<i>A. wolterstorffi</i>	731	Uruguai	-34.05613 -54.2417
<i>A. wolterstorffi</i>	732	Uruguai	-34.05613 -54.2417
<i>A. wolterstorffi</i>	733	Uruguai	-34.05613 -54.2417

<i>A. wolterstorffi</i>	726	Uruguai	-33.6639 -54.4726
<i>A. wolterstorffi</i>	727	Uruguai	-33.6639 -54.4726
<i>A. wolterstorffi</i>	728	Uruguai	-33.6639 -54.4726
<i>A. wolterstorffi</i>	712	Uruguai	-33.30413 -54.3373
<i>A. wolterstorffi</i>	713	Uruguai	-33.30413 -54.3373
<i>A. wolterstorffi</i>	721	Uruguai	-33.30413 -54.3373
<i>A. wolterstorffi</i>	722	Uruguai	-33.28456 -53.89343
<i>A. wolterstorffi</i>	714	Uruguai	-33.2587 -54.18353
<i>A. wolterstorffi</i>	715	Uruguai	-33.2587 -54.18353
<i>A. wolterstorffi</i>	718	Uruguai	-32.774716 -54.739716
<i>A. wolterstorffi</i>	734	Uruguai	-32.774716 -54.739716
<i>A. wolterstorffi</i>	735	Uruguai	-32.774716 -54.739716
<i>A. wolterstorffi</i>	736	Uruguai	-32.774716 -54.739716
<i>A. wolterstorffi</i>	739	Uruguai	-32.774716 -54.739716
<i>A. wolterstorffi</i>	740	Uruguai	-32.774716 -54.739716

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, nós caracterizamos os níveis de diversidade e diferenciação genética ao longo da área de distribuição de *A. wolterstorffi*. Nossas análises revelaram a presença de níveis significativos de diferenciação entre muitas populações, em um padrão de isolamento-por-distância. Adicionalmente, observamos que *A. wolterstorffi* encontra-se subdividida em pelo menos cinco diferentes grupos de populações. Isto sugere que fragmentação alopátrica ou vicariância tem desempenhado um papel importante na diversificação de *A. wolterstorffi*, que pode representar um complexo de espécies com um continuum de diferentes estágios de especiação.

Assim, de modo geral, confirmamos nossas hipóteses iniciais de existência de níveis pronunciados de diferenciação interpopulacional ao longo do sistema de lagunar Patos-Mirim, com potencial presença de diversidade críptica dentro de *A. wolterstorffi*, que perfaz, na verdade, um complexo de espécies. Essas hipóteses foram inicialmente lançadas em virtude do efeito esperado de altos níveis de deriva genética, em populações pequenas e isoladas. Além disso, padrões semelhantes vem sendo encontrados para diferentes espécies de peixes anuais (Jowers et al., 2007; García et al., 2009 and 2012; Ponce de León et al., 2014; García et al., 2015; Loureiro et al., 2015).

No entanto, nossa hipótese de existência de níveis reduzidos de diversidade intrapopulacional, não foi confirmada, à despeito da presença de populações pequenas e isoladas, e a ocorrência frequente de bottlenecks e efeitos fundadores. É possível que este resultado esteja relacionado à presença de altas taxas mutacionais nessa espécie, o que já foi previamente sugerido para os genomas mitocondriais de *Austrolebias* (García et al., 2000, 2002). Da mesma forma, a presença de altas taxas metabólicas (Cardozo, 1999), o curto tempo de geração e as características estressantes do ambiente que ocupam também podem estar associados a altas taxas de evolução. Em suma, mutações novas devem estar surgindo com uma frequência relativamente alta, de modo a compensar a variabilidade perdida por deriva genética. De modo geral, inclusive, essa putativa alta taxa mutacional poderia ser acrescida a já grande lista de adaptações apresentadas por esses peixes.

Assim, embora a presente dissertação tenha auxiliado no esclarecimento de algumas questões relativas à evolução e à taxonomia de *A. wolterstorffi*, possibilitando a delimitação futura de estratégias de conservação designadas especificamente para a manutenção da variabilidade desta espécie, novos desafios surgiram. Entre eles, podem-se citar como principais perspectivas deste trabalho:

- a caracterização e análise dos níveis de diversidade e estruturação apresentados pelo conjunto de espécimes amostrados para marcadores nucleares;

- a inclusão de análises crono-filogenéticas e crono-filogeográficas, de modo a abordar questões temporais do cenário associado a evolução de *A. wolterstorffi*, pela calibração e uso de taxas evolutivas específicas para o grupo e para o marcador utilizado;

- a realização de análises semelhantes em outras espécies de peixes anuais, pertencentes ou não ao gênero *Austrolebias*, que apresentem uma distribuição parcialmente simpátrica com *A. wolterstorffi*.